

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká Fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Eliška Svobodová

Příprava prasečích indukovaných pluripotentních kmenových buněk -  
model Huntingtonovy choroby

Generation of porcine induced pluripotent stem cells – a model  
of Huntington's disease

Diplomová práce

Školitel: MVDr. Jan Motlík, PhD., DrSc.

Praha, 2013

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému školiteli Prof. Janu Motlíkovi a konzultantovi Dr. Petrovi Vodičkovi za jejich vedení, cenné rady a podněty v průběhu diplomového projektu. Chtěla bych poděkovat i celému kolektivu laboratoře tkáňové regenerace a plasticity, zejména Ireně Liškové, kolektivu studentů na UŽFG a také Kateřině Vodičkové.

Zvláštní poděkování patří mé rodině, Lukášovi a přátelům.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 15. 8. 2013

Podpis

## Obsah

Obsah .....	3
1. Abstract .....	7
2. Abstrakt .....	8
3. Seznam zkratk .....	9
4. Literární úvod .....	12
4.1. Pluripotence a pluripotentní kmenové buňky .....	12
4.1.1. Myši a lidské embryonální kmenové buňky .....	13
4.1.2. ESCs dalších savčích druhů .....	14
4.1.3. Naivní a nakročená pluripotence .....	15
4.1.4. Naivní pluripotence lidských ESCs a iPSCs .....	17
4.1.5. Fyziologický základ LIF-závislé pluripotence .....	18
4.1.6. Molekulární mechanismy sebeobnovy ESCs .....	19
4.1.7. Geny pluripotence v raném embryonálním vývoji .....	23
4.2. Indukované pluripotentní kmenové buňky .....	24
4.2.1. Proces epigenetického přeprogramování somatických buněk .....	25
4.2.2. Metody přípravy indukovaných pluripotentních kmenových buněk .....	27
4.2.2.1. Malé molekuly v procesu přeprogramování somatických buněk .....	28
4.3. Pluripotentní buňky prasete .....	31
4.3.1. Pluripotence u prasat v raném embryonálním vývoji .....	31
4.3.2. Prasečí indukované pluripotentní kmenové buňky .....	32
4.3.2.1. Vliv malých molekul na dosažení stavu naivní pluripotence piPSCs .....	33
4.3.2.2. Tvorba chimér z piPSCs .....	34
4.3.3. Metody vhodné pro přeprogramování prasečích somatických buněk .....	36
4.3.3.1. MiRNA a indukovatelná exprese .....	37
4.3.3.2. PiggyBac transpozice .....	38
4.3.3.3. Nukleofekce .....	39
4.4. Huntingtonova choroba .....	40
4.4.1. Preklinické modely Huntingtonovy choroby .....	41

4.4.2. iPSCs pro modelování neurodegenerativních chorob .....	42
5. Materiál a metody .....	45
5.1. Seznam přístrojů .....	45
5.2. Materiál.....	46
5.2.1. Kultivace bakterií .....	46
5.2.2. Kultivace savčích buněk.....	46
5.2.3. Kalciumfosfátová transfekce.....	49
5.2.4. Detekce aktivity alkalické fosfatázy.....	49
5.2.5. Izolace plasmidové DNA .....	50
5.2.6. Vektory.....	50
5.3. Metody.....	55
5.3.1. Izolace primárních buněk .....	55
5.3.2. Kultivace buněk.....	55
5.3.2.1. Prasečí embryonální nervové kmenové buňky (NSCs).....	55
5.3.2.2. Prasečí embryonální fibroblasty (PEFs).....	55
5.3.2.3. SNL myší fibroblasty (podpurné buňky).....	56
5.3.2.4. Prasečí indukované pluripotentní kmenové buňky (piPSCs) .....	56
5.3.3. Pasážování buněk .....	56
5.3.4. Zamrazování buněk .....	57
5.3.5. Inaktivace SNL fibroblastů .....	57
5.3.6. Příprava plasmidové DNA .....	58
5.3.6.1. Elektroporace elektrokompetentních bakterií.....	58
5.3.6.2. Kultivace bakterií .....	58
5.3.6.3. Příprava glycerolového zásobního roztoku .....	58
5.3.6.4. Izolace plasmidové DNA .....	59
5.3.6.5. Agarozová elektroforéza .....	59
5.3.7. Metody transfekce .....	60
5.3.7.1. Lipofekce.....	60
5.3.7.2. Kalciumfosfátová transfekce.....	61

5.3.7.3. Nukleofekce .....	61
5.3.8. Přeprogramování primárních buněk .....	62
5.3.9. Izolace iPS-like kolonií .....	62
5. 3. 10. Detekce aktivity alkalické fosfatázy .....	62
5. 3. 11. Genotypizace .....	63
5. 3. 11. 1. Izolace genomické DNA .....	63
5.3.11.2. Primery .....	63
5.3.11.3. Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	64
6. Výsledky .....	66
6.1. Metody transfekce NSCs .....	66
6.2. Ověření funkčnosti EGFP vektoru v pNSCs .....	67
6.3. Lipofekce NSCs .....	67
6.4. Účinnost nukleofekce NSCs .....	67
6.5 Příprava prasečích iPS buněk z pNSCs .....	71
6.5.1. Zhodnocení vlivu Lin28 a kultivačních podmínek na proces přeprogramování .	73
6.5.2. Aktivita alkalické fosfatázy piPSCs .....	75
6.5.3. Účinnost přeprogramování NSCs .....	76
6.5.4. Genotypizace iPS buněk vytvořených z NSCs .....	77
6.5.5. Otestování indukibilního MiRNA vektoru pro přeprogramování pNSCs .....	79
6.6. Příprava prasečích iPS buněk z PEFs .....	80
7. Diskuze .....	83
7.1 MiRNA pro vytváření savčích iPSCs .....	83
7.2 Vektory typu PiggyBac .....	83
7.3 Metody transfekce .....	84
7.4 Kultivační podmínky a transkripční faktory .....	85
7.5 Přeprogramování PEFs .....	88
7.6 Charakterizace piPSCs připravených z NSCs .....	88
7.7 Potenciál HD-piPSCs pro modelování HD .....	89
8. Závěr .....	90

9. Seznam literatury .....	91
----------------------------	----

## 1. Abstract

Stable porcine ES cell lines have not been successfully established yet. Ability to self-renew or to differentiate has been limited in different porcine ES-like cell lines so far. PiPSCs represent an alternative to pESCs. PiPSCs can be generated by reprogramming of somatic cells by introduction of several transcription factors on viral vectors and were established by several groups. However, the majority of piPS cell lines depend on transgene expression because of incomplete reprogramming and weak activation of endogenous pluripotency genes. Transgene expression can influence differentiation potential of piPSCs.

Therefore, we have used integrative and reexcisable PiggyBac transposons to generate viral-free piPSCs. At the same time, small molecules (low-molecular inhibitors) with potential to increase reprogramming efficiency and to activate endogenous pluripotency genes were used in the reprogramming media. This strategy has a potential for generation of naive piPSCs. Successful excision of transgenes would generate transgene-free piPSCs with uncompromised differentiation potential.

Pig (*Sus Scrofa*) is at the same time an important animal model in preclinical stage research of the diseases. Somatic cells used for generation of piPSCs were isolated from pigs carrying mutated huntingtin. Integration of the sequence coding for N-terminal part of human huntingtin was confirmed in the source somatic cells as well as the reprogrammed cells. Generated piPSCs can be used to confirm the Huntington's disease phenotype *in vitro* and for possible drug testing before their application *in vivo*.

Key words: Porcine induced pluripotent stem cells, PiggyBac, small molecules, Huntington's disease, preclinical model.

## 2. Abstrakt

Dosud se nepodařilo vytvořit stabilní linie prasečích ESCs. Linie prasečích ES-like buněk nejsou schopné dlouhodobé sebeobnovy nebo mají omezenou schopnost diferenciaci. Alternativou k pESCs jsou piPSCs, které lze vytvořit přeprogramováním somatických buněk několika transkripčními faktory nesenými virovými vektory. Linie piPSCs se podařilo vytvořit několika skupinám. Většina linií piPSCs je ale závislá na transgenní expresi z důvodu nedokončeného procesu přeprogramování a nedostatečné aktivace vlastních genů pluripotence. Zvýšená exprese vnesených transgenů má negativní vliv na schopnost diferenciaci piPSCs.

Proto byly pro vytvoření piPSCs v této práci použity nevirové Piggybac transpozony, které lze z genomu zpětně vystříhnout. Zároveň byly pro přeprogramování použity malé molekuly (nízkomolekulární inhibitory), které jsou schopné zvýšit účinnost přeprogramování a aktivaci endogenních genů pluripotence. Tento systém pro vytvoření piPSCs má potenciál k vytvoření piPSCs v naivním stavu pluripotence. Po vystřížení transgenů je možné získat piPSCs bez inserčních mutací a s neomezenou schopností diferenciaci.

Prase (*Sus Scrofa*) je zároveň důležitým zvířecím modelem pro preklinické stadium výzkumu nemoci. Pro vytvoření piPSCs byly použity primární buňky z prasat s mutovaným huntingtinem. Integrace sekvence kodující N-terminální část lidského mutovaného huntingtinu byla potvrzena. Vytvořené piPSCs mohou zároveň sloužit k ověření fenotypu Huntingtonovy choroby *in vitro* a k případnému testování léčiv před jejich aplikací *in vivo*.

Klíčová slova: Prasečí indukované pluripotentní kmenové buňky, PiggyBac, malé molekuly, Huntingtonova choroba, preklinický model.



### 3. Seznam zkratek

2i – podmínky kultivace ESCs s inhibitory MEK/ERK a GSK3 $\beta$

3i – podmínky kultivace ESCs s inhibitory MEK/ERK, GSK3 $\beta$  a FGFR

AKT – známá jako PKB (protein kináza B)

Ala-glu – alanyl-glutamin

ALK5 – receptoru podobná kináza aktivinu 5 (activin receptor-like kinase 5)

aNSCs – NSCs izolované z postnatální tkáně mozku (adult NSCs)

AZA – 5-Azacytidin

bFGF – bazický fibroblastový růstový faktor (basic fibroblast growth factor)

BME –  $\beta$ -mercaptoethanol

BMP4 – kostní morfogenetický protein (bone morphogenetic protein)

cAMP – cyklický adenosinmonofosfát

CDX2 – homeobox 2 ocasního typu (caudal type homeobox 2)

c-Myc – transkripční faktor, buněčný homolog onkogenního proteinu viru ptačí myelocytomatozy (Avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog)

CT – počítačová tomografie (computer tomography)

D – den od transfekce (př. D 18 – 18. den od transfekce)

dH<sub>2</sub>O – destilovaná voda

DMEM – Dulbeccovo modifikované Eagle médium (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

DMSO – dimethylsulfoxid

DNMT – DNA-methyltransferasa

Dox – doxycyklin

E – den embryonálního vývoje

EDTA – ethylendiaminetetraoctová kyselina (ethylenediaminetetraacetic acid)

EGCs – embryonální zárodečné buňky (embryonic germ cells)

EGF – epidermální růstový faktor (epidermal growth factor)

EGFP – zelený fluorescenční protein se zrychleným zráním (enhanced GFP)

EMT – epiteliálně-mesenchymální transice

EpiSCs – epiblastové kmenové buňky (epiblast stem cells)

ERK - Vnější signálem regulovaná kináza (extracellular signal-regulated kinase)

F1,F2 - filiální generace, generace potomků

FBS – fetální bovinní sérum (fetal bovine serum)

FK – Forskolin, inhibitor adenylyl cyklázy

gDNA – genomická DNA

GFP - green fluorescent protein

h - lidské

H3K4 – podjednotka histonu 3, lysin 4

HDAC – histondeacetyláza

HEPES – 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina

HD – Huntingtonova choroba

HTT – huntingtin  
 Hy – PiggyBac transpozáza (HyPBase)  
 CHIR – inhibitor GSK3 $\beta$  CHIR 99021  
 ICM – vnitřní buněčná masa (inner cell mass)  
 iESCs – indukované ESCs, ESCs vytvořené přeprogramováním EpiSCs, ICM nebo ESCs v nakročeném stavu pluripotence  
 iMEFs – inaktivované MEFs používané jako podpůrné buňky pro kultivaci ESCs/iPSCs  
 iPS, iPSCs – indukované pluripotentní kmenové buňky (induced pluripotent stem cells)  
 IRES – vnitřní místo pro vstup ribosomu (internal ribosomal entry site)  
 Klf4 – transkripční faktor, homologické Kruppel faktorům *D. Melanogaster* (Kruppel-like factor 4)  
 Ko – kontrola  
 KO-DMEM – KnockOut™ DMEM  
 KSR – KnockOut™ náhražka séra (serum replacement)  
 LIF – leukemický inhibiční faktor (leukemia inhibitory factor)  
 LIN28 - lin-28 homolog  
 LRH-1 - homolog jaterního receptoru 1 (liver receptor homolog 1)  
 LSD 1 – demethyláza lysinu na histonech 1 (lysine specific demethylase 1)  
 m - myši  
 MAO-1 – monoaminoxidáza 1  
 MAPK – mitogenem aktivovaná protein kináza  
 MEFs – myší embryonální fibroblasty  
 MEK – jinak MAPKK – kináza MAPK  
 MET – mesenchymálně-epiteliální transice  
 mHTT – mutantní huntingtin  
 MiRNA – microRNA, krátké RNA molekuly s regulační funkcí  
 MiR – gen pro miRNA klastr 302/367  
 NEAA – neesenciální aminokyseliny (non-essential amino acids)  
 NSCs – nervové kmenové buňky (neural stem cells)  
 NSC-OSKM – NSCs transfekované vektorem s geny OSKM  
 NSC-OSKML - NSCs transfekované vektorem s geny OSKML  
 NT Ko – kontrola bez templátu (no template control)  
 OCT4 – transkripční faktor 4 vázající motiv oktameru (octamer-binding transcription factor 4, znám také jako Oct3/4 nebo POU5F1)  
 OSKM – Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc  
 OSKML – Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, Lin28  
 OSKMNL - Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog, Lin28  
 p – prasečí  
 PB – Piggybac (typ transpozonu a z něj odvozených vektorů)  
 PBS – fosfátový pufr (phosphate buffer saline)  
 PD – inhibitor MEK PD 0325901

pDNA – plasmidová DNA  
 PE – primitivní entoderm  
 PEFs – prasečí embryonální fibroblasty  
 PET – pozitronová emisní tomografie  
 PI3K - Phosphatidylinositid 3-kináza  
 piPSCs – prasečí iPS buňky  
 pNSCs – prasečí NSCs  
 PGCs – primordiální zárodečné buňky (primordial germ cells)  
 PRDM14 - PR domain zinc finger protein  
 PSCs – pluripotentní kmenové buňky (ESCs i iPSCs)  
 PTEN – homolog fosfatázy a tensinu (phosphatase and tensin homolog)  
 RAR- $\gamma$  - receptor kyseliny retinové  $\gamma$  (retinoic acid receptor  $\gamma$ )  
 REX1 – Výměník Rac proteinu 1 (Rac exchanger 1)  
 rpm – otáčky za minutu (rotations per minute)  
 SCF – faktor kmenových buněk (stem cell factor)  
 SCNT – přenos jádra somatické buňky do enukleovaného oocyty (somatic cell nuclear transfer)  
 SD – směrodatná odchylka (standard deviation)  
 Smad – proteiny příbuzné Sma a Mad (Sma and Mad related proteins)  
 SOX2 – SRY (pohlaví určující oblast Y) box 2 [SRY (sex determining region Y)-box 2]  
 SSEA – stádiově specifický nádorový antigen (stage specific tumor antigen)  
 STAT3 – přenašeč signálu a aktivátor transkripce 3 (Signal transducer and activator of transcription 3)  
 SNL – myší fibroblasty STO (odvozené ze SIM myších embryí a resistantní k Thioguaninu a Quabainu) - neomycin – LIF  
 TAE – TRIS – acetát – EDTA  
 TBX3 - T-box 3  
 TE - trofektoderm  
 TF – transkripční faktor  
 TGF $\beta$  - nádorový růstový faktor beta (tumor growth factor beta)  
 TR – Tranlycypromin, inhibitor LSD1 a MAO-1  
 TRA – antigen nepřijetí nádoru (tumor rejection antigen)  
 TRIS - tris(hydroxymethyl)aminometan  
 VE – ventrální entoderm  
 VPA – kyselina valproová (valproic acid)  
 WNT – homolog Wingless *D. Melanogaster*  
 WtHTT – normální huntingtin (wildtype huntingtin)

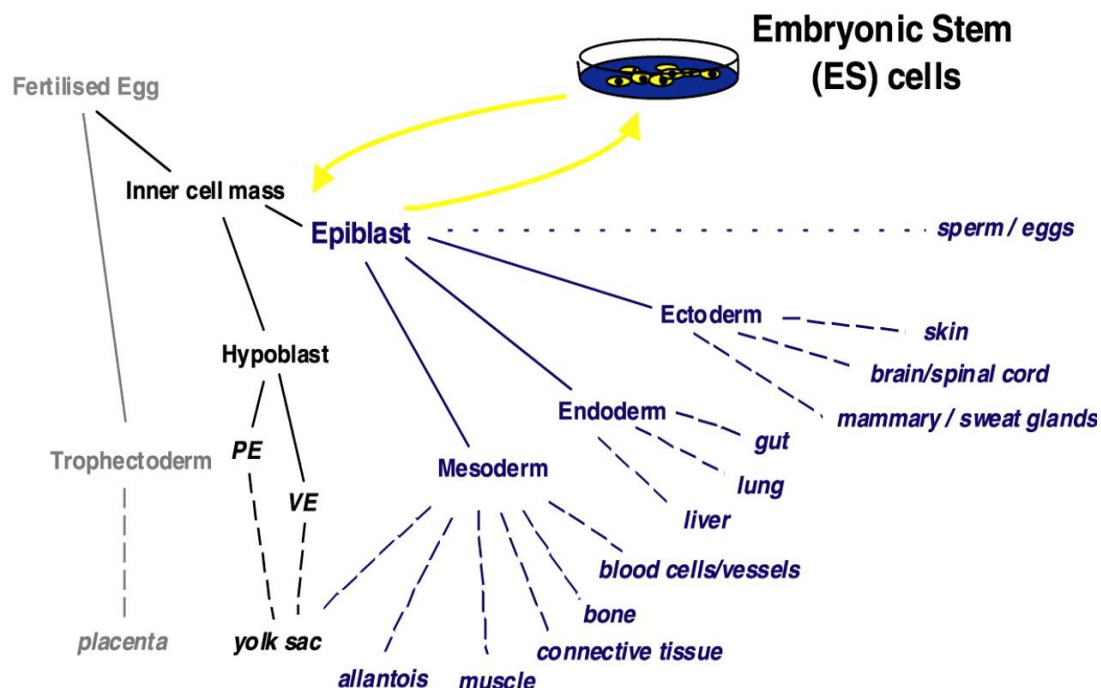
## 4. Literární úvod

### 4.1. Pluripotence a pluripotentní kmenové buňky

Pluripotence je schopností buněk dát vznik všem buněčným typům těla. Na rozdíl od buněk totipotentních, kterými jsou zygota a buňky raného embrya do dvou až osmibuněčného stadia (McGrath a Solter 1984, Tarkowski a Wróblewska 1967, Van de Velde et al. 2008), nemají pluripotentní buňky organizační schopnost vytvořit celé embryo včetně extraembryonálních tkání, nemohou dát vznik trofoblastu.

*In vivo* se pluripotentní buňky vyskytují pouze přechodně během raného embryonálního vývoje. Ve stadiu blastocysty u savců tvoří pluripotentní buňky vnitřní buněčnou masu embrya (ICM, inner cell mass). Buňky ICM následně dávají vznik hypoblastu a epiblastu, který je také tvořen pluripotentními buňkami. Z hypoblastu vzniká primitivní a viscerální endoderm (PE a VE) a následně žloutkový váček embrya. Buňky epiblastu dávají vznik všem embryonálním tělním tkáním a několika dalším extraembryonálním tkáním (shrnuť v Cockburn a Rossant 2010, Suwinska a Ciemerych 2011, obrázek 1).

Pluripotentní buňky embrya lze izolovat a vytvořit linie embryonálních kmenových buněk (ESCs, embryonic stem cells) z buněk ICM a raného epiblastu pozdní blastocysty (Bryja et al. 2006), nebo epiblastových kmenových buněk (EpiSCs, epiblast stem cells) z buněk pozdního epiblastu po implantaci blastocysty (Chenoweth et al. 2010, Tesar et al. 2007). Takto izolované pluripotentní kmenové buňky jsou charakteristické schopností sebeobnovy v podmínkách *in vitro*. Symetrickým dělením jsou schopné dlouhodobě (potenciálně neomezeně) stav pluripotence udržovat. Zároveň si udržují schopnost diferenciaci do všech embryonálních a postnatálních tělních tkání včetně zárodečných buněk (Smith 2001). Pluripotentní kmenové buňky lze připravit *in vitro* také epigenetickým přeprogramováním somatických buněk. Tyto indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSCs) (Takahashi a Yamanaka 2006) jsou funkčně rovnocenné ESCs nebo EpiSCs.



**Obrázek 1:** Zobrazuje postupnou diferenciaci buněčných linií během raného embryonálního vývoje. Embryonální kmenové buňky mohou být izolovány z vnitřní buněčné masy a z epiblastu. Převzato ze (Smith 2001).

#### 4.1.1. Myší a lidské embryonální kmenové buňky

Historicky se jako první podařilo izolovat embryonální kmenové buňky z myší ICM a kultivovat je na vrstvě inaktivovaných myších embryonálních fibroblastů (iMEFs, jeden z typů podpůrných buněk) (Evans a Kaufman 1981, Martin 1981). Myší ESCs (mESCs) tvoří vystouplé 3D kolonie, které mohou být pasážovány jako jednotlivé buňky. Tyto jednotlivé buňky jsou schopné kolonie obnovit. Pro udržení stavu pluripotence mESCs *in vitro* je klíčová LIF/STAT3 (Matsuda et al. 1999, Niwa et al. 1998) a BMP4 signalizace, pokud jsou mESCs kultivovány v bezsérových podmínkách bez iMEFs (Ying et al. 2003). LIF/STAT3 dráha není naopak schopná udržet stav pluripotence lidských ESCs (hESCs) (Dahéron et al. 2004) a BMP4 vede k jejich diferenciaci (Xu et al. 2002, Xu et al. 2005).

HESCs se podařilo izolovat až mnohem později (Thomson et al. 1998), po předchozí izolaci ESCs nehumánních primátů (druhy *Macaca Mulata*, *Callithrix jacchus*) (Thomson et al. 1995, Thomson et al. 1996). Lidské i primátní ESCs se morfologií od mESCs liší. Tvoří ploché kolonie, které nelze účinně pasážovat jako jednobuněčnou suspenzi. Disociované buňky jsou náchylné k apoptoze a kolonie regenerují s velmi nízkou účinností (< 1 %). Tyto

ESCs byly kultivovány na vrstvě iMEFs, bez podpůrných buněk ESCs diferencovaly i v přítomnosti LIF (Thomson et al. 1995, Thomson et al. 1996, Thomson et al. 1998).

HESCs izolované z ICM udržují *in vitro* pluripotentní stav v přítomnosti bFGF (také znám jako FGF2) (Xu et al. 2005). bFGF vede k produkci TGFβ1 a Activinu A v iMEFs a k produkci inhibitorů prodiferenčního BMP4 (Greber et al. 2007). Suplementace média Activinem A (Beattie et al. 2005) nebo právě inhibitorem BMP4 Nogginem (Xu et al. 2005) pomáhá udržovat stav pluripotence hESCs v podmínkách bez iMEFs.

Odlišnosti převládají i u povrchových markerů ESCs. HESCs a primátů ESCs exprimují SSEA-3, SSEA-4, TRA 1-60 a TRA 1-81. MESCs jsou naopak pozitivní na SSEA-1 (Henderson et al. 2002). Společnými markery jsou naopak aktivita alkalické fosfatázy a katalytické podjednotky telomerázy (Thomson et al. 1998).

Projevem pluripotence ESCs je jejich schopnost diferencovat *in vitro* (Doetschman et al. 1985) a *in vivo* do tkání všech zárodečných vrstev. Testem schopnosti diferenciaci ESCs *in vivo* je jejich vstříknutí do imunodeficientních myší a sledování tvorby diferencovaných teratomů složených z tkání všech zárodečných vrstev. Nejprísnejším kritériem posouzení pluripotence je testování schopnosti ESCs tvořit chiméry s přispěním k zárodečné linii (Beddington a Robertson 1989, Evans a Kaufman, 1983 in Rossant et al. 1993). Myší ESCs jsou schopné vytvořit celé embryo v testu tetraploidní komplementace (Nagy et al. 1990). U lidských ESCs není test tvorby chimér prováděn z etických důvodů.

#### **4.1.2. ESCs dalších savčích druhů**

U většiny hospodářských a domácích zvířat se zatím nepodařilo vytvořit linie ESCs se stabilní schopností sebeobnovy ve stavu pluripotence. ESC-like buňky kočičí (*Felis silvestris*) (Yu et al. 2008), psí (*Canis lupus*) (Hatoya et al. 2006), bovinní (*Bos primigenius taurus*) (Cao et al. 2009, Pant a Keefer 2009), kozí (*Capra hircus*) (Kumar De et al. 2011), ovčí (*Ovis aries*) (Zhao et al. 2011, Zhu et al. 2007) nebo prasečí (*Sus Scrofa*) (Vassiliev et al. 2011) nedokázaly v kultuře dlouhodobě udržet nediferencovaný stav. Ve většině případů lépe rostly v kultivačních podmínkách s bFGF abyly podobnější lidským ESCs.

ESCs izolované z dalších savčích druhů jsou často na pomezí mezi hESCs a mESCs nebo u nich není úplná shoda na vhodných kultivačních podmínkách a povrchových znacích. Buvolí ESCs jsou celkově svými znaky podobnější hESCs, ale poslední studie ukazuje, že mohou udržovat stav pluripotence v podmínkách s LIF (*Bubalus bubalis*) (Muzaffar et al. 2012). Králíčí ESCs (*Oryctolagus cuniculus*) (Honda et al. 2009, Hsieh et al. 2011, Wang et al. 2007, Xue et al. 2012) udržují stav pluripotence v podmínkách s bFGF i LIF, ale

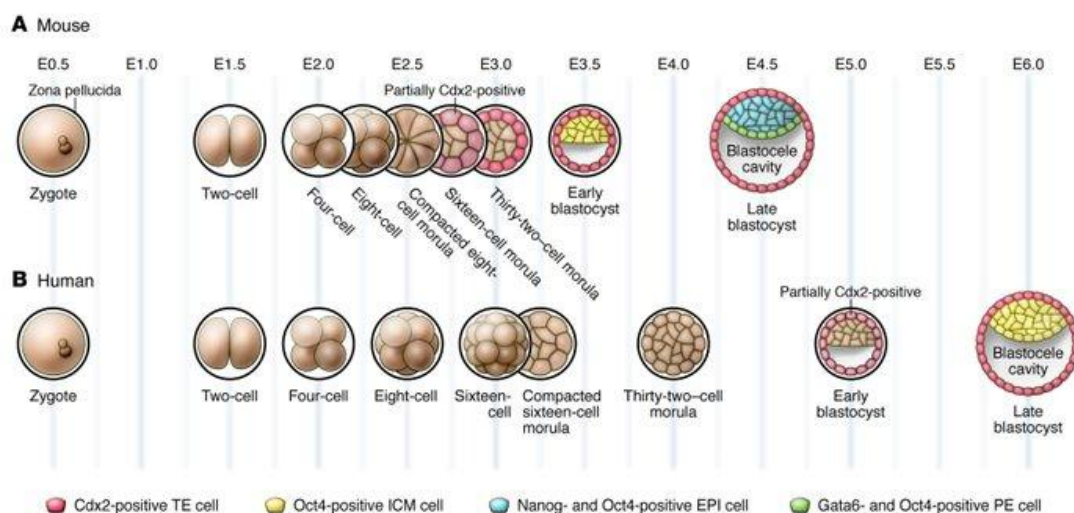
hodnocení jednotlivých studií ohledně jejich podobnosti hESC nebo mESCs se liší. Jsou ale kultivovány na podpůrných buňkách a pasážovány jako shluky buněk. U ESCs skotu (*Bos primigenius taurus*) také není shoda na vhodných kultivačních podmínkách ESCs (Cao et al. 2009, Pant a Keefer 2009).

Studií týkajících se izolace a charakterizace ESCs nebo EpiSCs hospodářských a dalších savčích druhů je celá řada. Byly zveřejněny pokusy o tvorbu chimér z ESCs některých z těchto druhů, jejíž účinnost je u všech druhů mimo permissivních kmenů myši velmi nízká. Tuto problematiku shrnují přehledné články (Hall et al. 2013, Keefer et al. 2007).

#### **4.1.3. Naivní a nakročená pluripotence**

Nový pohled na problematiku pluripotence savčích buněk vnesla izolace myších epiblastových kmenových buněk (mEpiSCs), které se shodovaly kultivačními podmínkami s bFGF, morfologií a dalšími znaky s hESCs a ESCs dalších druhů (Brons et al. 2007, Tesar et al. 2007). Mezi tyto znaky patří i inaktivace jednoho z X chromosomů u samičích linií mEpiSCs a hESCs. Inaktivace X u samičích linií je *in vivo* charakteristická pro stadium epiblastu (Silva et al. 2008a). EpiSCs, podobně jako ESCs hospodářských druhů zvířat, jsou velmi neefektivní v tvorbě chimér a nejsou schopné přispět k jejich zárodečné linii (Brons et al. 2007, Guo et al. 2009). Neschopnost vytvářet chiméry s přenosem do zárodečné linie představuje problém z praktického hlediska. Takové ESCs nemohou být u hospodářských zvířat využívány k vytvoření plemen s vylepšenými vlastnostmi nebo pro vytvoření knock-out/knock-in zvířat jako velkých zvířecích modelů nemocí metodou homologní rekombinace (Thomas a Capecchi 1987).

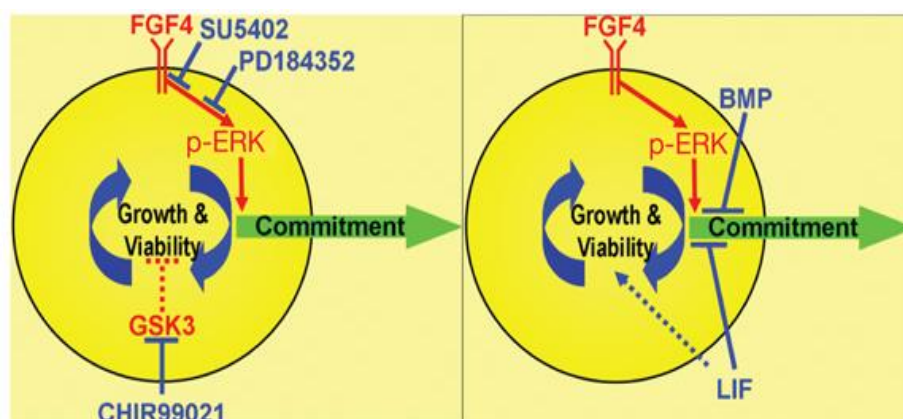
Objev mEpiSCs ukázal na podobnost některých druhově specifických ESCs spíše s pozdním epiblastem než s ICM ze které jsou standardně izolovány. Vzniklo tak označení dvou rozdílných stavů pluripotence, které mohou být *in vitro* zaujímány pluripotentními kmenovými buňkami. MESCs dokážou dlouhodobě udržovat stav naivní (anglicky *naive*) pluripotence, zatímco hESCs a mEpiSCs zaujímají stav nakročené (anglicky *primed*) pluripotence (Nichols a Smith 2009). Rozdíly v načasování raného embryonálního vývoje a vzniku populace pluripotentních buněk u myši a člověka jsou popsány na obrázku 2. Tyto odlišnosti jsou jednou z příčin rozdílných vlastností ESCs těchto druhů.



**Obrázek 2:** Porovnání raného (preimplantačního) embryonálního vývoje myši (A) a člověka (B). A - Myší embryo dosahuje stadia rané blastocysty s vnitřní buněčnou masou (žlutě) v den embryonálního vývoje (E) 3.5 a stadia pozdní blastocysty s ICM rozdělenou na epiblast (modře) a hypoblast (zeleně) v E4.5. B – U lidského embrya je vývoj časově zpožděn, OCT4 pozitivní pluripotentní buňky se objevují až v epiblastu pozdní blastocysty (E6.0). Převzato z Cockburn a Rossant (2010).

Některé nepermisivní kmeny myši (Hanna et al. 2009a, Kiyonari et al. 2010) a potkani (Brons et al. 2007) jsou přístupní pouze izolaci EpiSCs z pozdního epiblastu, nikoli LIF-závislých ESCs. Několik studií ale ukázalo, že ESCs a EpiSCs v nakročeném stavu pluripotence lze přivést do stavu naivní pluripotence změnou kultivačních podmínek nebo částečným přeprogramováním. MEpiSCs a potkaní EpiSCs byly přivedeny do naivního stavu pluripotence inhibicí MEK/ERK a GSK3 $\beta$  (2i podmínky kultivace, obrázek 3) a kultivací v LIF spolu s ektopickou expresí KLF4 (Guo et al. 2009). Zároveň se podařilo izolovat mESC s v naivním stavu pluripotence z nepermisivního myšího kmene C57BL/6N v 3i podmínkách kultivace (2i + inhibice FGFR) s LIF (Kiyonari et al. 2010). Takto izolované ESCs i přeprogramované EpiSCs byly schopné tvořit chiméry s přispěním k zárodečné linii (Guo et al. 2009, Kiyonari et al. 2010), což dokládá dosažení stavu naivní pluripotence. V práci Ying et al. (2008b) byly v 2i kultivačních podmínkách úspěšně izolovány a kultivovány mESC s permisivního kmene myši bez přítomnosti LIF (obrázek 3). To ukazuje na posun v signalizaci MEK/ERK u myších kmenů, které jsou permisivní pro izolaci ESCs v naivním stavu pluripotence. U těchto kmenů myši má LIF pravděpodobně schopnost stabilně vyrovnávat pro- a proti- diferenciační signály a inhibovat prodiferenciační účinek MEK/ERK. U dalších druhů tuto schopnost LIF nemá a prodiferenciační účinek MEK/ERK signalizace převládá, pokud není inhibována farmakologicky.





**Obrázek 3:** 2i (inhibitor GSK3 $\beta$  CHIR99021, inhibitor MEK/ERK PD184352)/3i (2i + inhibitor FGFR SU5402) podmínky kultivace vedou ke stabilní sebeobnově ESCs v naivním stavu pluripotence. Dalším používaným inhibitorem MEK/ERK, který může PD184352 nahradit je PD0325901. Obrázek je převzat z práce Ying et al. (2008b).

#### 4.1.4. Naivní pluripotence lidských ESCs a iPSCs

Potkaní iESCs jsou po přeprogramování KLF4 schopné sebeobnovy v 2i/LIF podmínkách bez transgenní exprese a jsou schopné tvorby chimér s přenosem do zárodečné linie (Guo et al. 2009). U hiESCs a hiPSCs je situace odlišná. HESCs přeprogramované do naivního stavu pluripotence zvýšenou expresí transgenů byly závislé na expresi OCT4 a KLF4 nebo KLF4 a KLF2 v 2i/LIF podmínkách (Hanna et al. 2010). Stablnější stav naivní pluripotence nezávislý na transgenní expresi byl dosažen až přidáním Forskolinu (FK) k 2i/LIF. Forskolin aktivuje adenylátcyklázu, která vede přes aktivaci cAMP k aktivaci PKA signalizace (Seamon et al. 1981, Delghandi et al. 2005). Bohužel tyto naivní hiESCs nebyly schopné sebeobnovy více než 15 – 20 pasáží, ale autoři spekulují, že by to mohlo být i toxickou reakcí buněk na FK (Hanna et al. 2010). V jedné studii se podařilo vytvořit lidské naivní iPSCs ektopickou expresí OSKM, receptoru kyseliny retinové  $\gamma$  (RAR- $\gamma$ , retinoic acid receptor  $\gamma$ ) a homologu jaterního receptoru 1 (LRH-1, liver receptor homolog 1). Tyto naivní hiPSCs byly schopné sebeobnovy nezávisle na transgenní expresi a udržovaly si dlouhodobě znaky naivní pluripotence (Wang et al. 2011). Li et al. (2009a) vytvořili naivní hiPSCs se stabilní schopností sebeobnovy v podmínkách s 2i/LIF a inhibitorem ALK5 A-83-01.

Lidské iPSCs nebo ESCs nedokážou robustně tvořit naivní stav pluripotence nezávislý na transgenní expresi. Nezávislost hiPSCs/hiESCs na transgenní expresi byla ukázána jen u několika studií a vyžadovala použití více faktorů pro přeprogramování nebo zvláštní

kultivační podmínky. Přehled více studií na toto téma je v přehledném článku De Los Angeles et al. (2012).

#### 4.1.5. Fyziologický základ LIF-závislé pluripotence

LIF-závislá pluripotence je oproti původnímu očekávání mnohem méně druhově rozšířená. Tento fenomén má příčinu v adaptivní schopnosti hlodavců řízeně zastavit vývoj embrya před jeho zahnížděním v děloze právě ve stadiu blastocysty, obsahující ICM. Toto přechodné zastavení embryonálního vývoje se nazývá diapauza (Mantalenakis a Ketchel 1966). Diapauza je běžným jevem i u dalších savců, ale z kopytníků (*Artiodactyla*) se vyskytuje jen u srnce (*Capreolus capreolus*) (shrnutí v Renfree a Shaw 2000). Zatímco u většiny savců je LIF nezbytný pouze krátce pro zahníždění blastocysty v děloze (Aghajanova 2004), u hlodavců je jeho role rozšířena na schopnost udržovat latentně populaci buněk epiblastu během diapauzy signalizací LIF přes GP130/LIFR receptor (Nichols et al. 2001). Podobně jako je diapauza způsobem, jak zastavit embryonální vývoj *in vivo*, je izolace a kultivace mESCs její analogií *in vitro*. U většiny ostatních savců není fyziologický základ pro dlouhodobější udržení LIF-závislé pluripotence vytvořen nebo nebyl během evoluce zachován. Naivní stav pluripotence je tak velmi nestabilní i v *in vitro* podmínkách a může být stabilizován pouze inhibicí drah, které jinak vedou k diferenciaci, a následně k sebeobnově stabilnějšího pozdního epiblastu.

Ne všichni hlodavci a ne všechny kmeny myší ale mohou dát vznik liniím naivních ESCs za standardních podmínek. Významný vliv na schopnost vytvářet ESCs v naivním stavu pluripotence mají zřejmě i další faktory. Jedním z nich může být tendence některých kmenů myší k tvorbě testikulárních teratokarcinomů (nádorů samčích zárodečných buněk). Takovým myším kmenem je kmen 129, ze kterého byly poprvé izolovány mESCs, zároveň je izolace mESCs z myší tohoto kmene účinnější než z jiných kmenů (Anderson et al. 2009). Naopak jiné kmeny myší nebo potkani, u kterých jsou teratokarcinomy vzácné, jsou nepermisivní k tvorbě ESCs. Za standardních podmínek je možné z jejich pozdních blastocyst izolovat pouze EpiSCs (Battle-Morera et al. 2008, Brons et al. 2007, Hanna et al. 2009a).

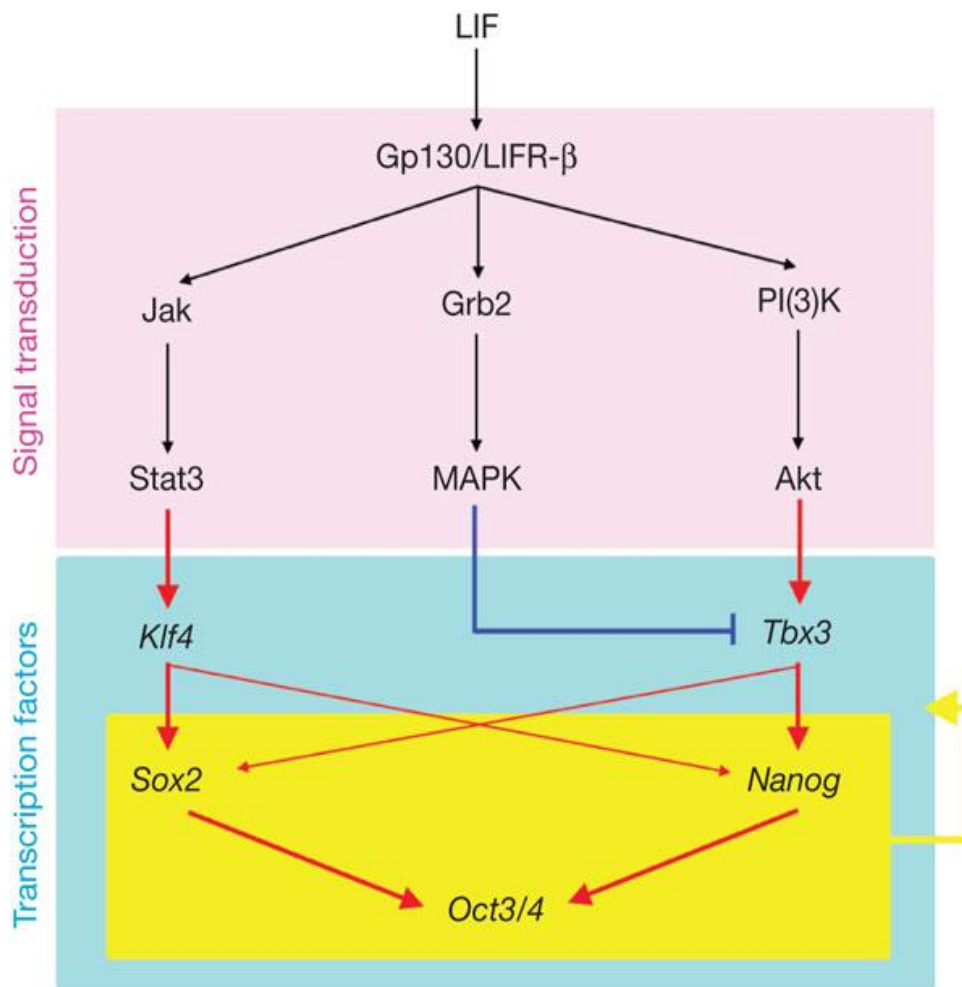
Tendence tvořit teratokarcinomy může souviset se změnou v PI3K/AKT signalizaci, která vede k ustanovení embryonálních zárodečných buněk (EGCs) z primordiálních zárodečných buněk (PGCs) a zároveň je jednou z drah aktivovaných LIF u mESCs (Kimura et al. 2008, Kimura a Nakano 2011, obrázek 4). Na druhou stranu ale není PI3K/AKT pro sebeobnovu mESCs esenciální (Matsuda et al. 1999). EGCs, kmenové buňky se schopností sebeobnovy odvozené *in vitro* z PGCs, mohou dlouhodobě udržovat stav pluripotence v médiu s LIF,

bFGF a SCF (stem cell factor, faktor kmenových buněk) (Matsui et al. 1992, Resnick et al. 1992). Zároveň ztráta PTEN fosfatázy, která jinak inhibuje PI3K signalizaci, vedla ke zvýšení výskytu teratokarcinomů u myši (Kimura et al. 2003). Tuto signální provázanost mESCs a mEGCs podtrhuje i zvýšená exprese genů *Stella*, *Rex1* nebo *Prdm14* u mESCs, které jsou zároveň markery prekursorů zárodečných buněk (Grabole et al. 2013, Hayashi et al. 2008, Toyooka et al. 2008). Tyto geny přitom nejsou exprimovány buňkami raného epiblastu. Nelze proto vyloučit možnost, že naivní mESCs jsou velmi ranými prekury PGCs pocházejícími z epiblastu adaptovanými na kultivační podmínky podobně jako EGCs. Druhou možností je, že pouze stejné faktory ovlivňují vytvoření pluripotentních ESCs a EGCs.

#### **4.1.6. Molekulární mechanismy sebeobnovy ESCs**

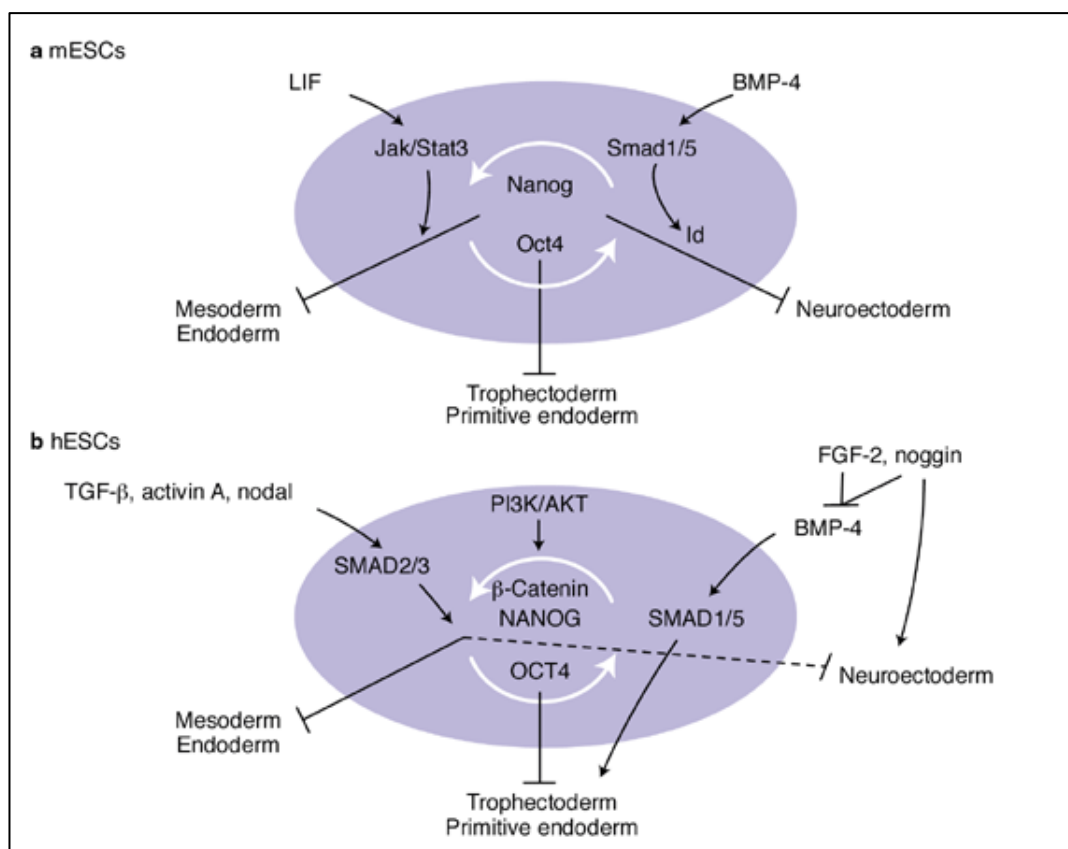
ESCs izolované z různých druhů mají přes odlišnosti v kultivačních podmínkách společný centrální okruh pluripotence, který je aktivován a udržován v rovnováze vnější signalizací. Hlavními součástmi centrálního okruhu pluripotence jsou transkripční faktory OCT4, SOX2 a NANOG. Tyto tři proteiny tvoří zpětnovazebnou smyčku, která udržuje stav pluripotence a zabraňuje diferenciaci ESCs. OCT4, SOX2 a NANOG vzájemně udržují své vlastní hladiny na optimální úrovni potřebné pro udržení stavu pluripotence (Boyer et al. 2005, Loh et al. 2006, Rodda et al. 2005), aktivují další stovky genů, které tvoří širší regulační okruh udržující schopnost sebeobnovy pluripotentních ESCs a brání přepisu genů zodpovědných za diferenciaci (Boyer et al. 2005, Loh et al. 2006, shrnuto v Loh et al. 2008). Na promotory velké části cílových genů v hESCs nasedají OCT4, SOX2 i NANOG zároveň (Boyer et al. 2005). U mESCs byla popsána kooperace v nasedání OCT4 a NANOG na promotory cílových genů (Loh et al. 2006).

Zatímco hladina OCT4 a SOX2 musí být striktně regulována a jejich příliš vysoká i příliš nízká hladina vede k diferenciaci ESCs (Kopp et al. 2008, Niwa et al. 2000), zvýšená hladina NANOG umožňuje sebeobnovu mESCs (Mitsui et al. 2003) i hESCs bez růstových faktorů a podpůrných buněk. U hESCs se zvýšenou hladinou NANOG ale dochází k expresi genů primitivního ektodermu (pluripotentního epiblastu) ve shodě s vyšší stabilitou pluripotentního epiblastu (Darr et al. 2006).



**Obrázek 4:** LIF spouští v mESCs aktivaci více signálních drah zároveň. Aktivace JAK/STAT3 a PI3K/AKT signalizace vedou k aktivaci genů pluripotence *Sox2* respektive *Nanog*, které pak aktivují *Oct4*. Naopak aktivní MAPK signalizace spouštěná LIF inhibuje aktivaci *Tbx3* a v důsledku *Nanog*. LIF signalizace tak vede k rovnováze pro- a protidiferenčních signálů (Niwa et al. 2009).

Centrální geny pluripotence jsou aktivovány již zmíněnými vnějšími signály, které se mezidruhově liší. U mESCs jsou *Nanog*, *Oct4* i *Sox2* aktivovány právě LIF/STAT3 signalizací a BMP4/SMAD1 (Chen et al. 2008), u hESCs kooperují vzájemně zastupitelné TGFβ/Activin/SMAD 2/3 a bFGF/MEK/ERK signalizace v aktivaci *Nanog* (Xu et al. 2008) a dalších genů asociovaných s pluripotencí (Brown et al. 2011). Napojení vnějších signalizace na okruh pluripotence je naznačeno na obrázku 5.



**Obrázek 5:** Signální dráhy udržující stav pluripotence sebeobnovu mESCs (a) a hESCs (b), a zároveň inhibující diferenciaci. Znárodně je i napojení vnější signalizace na centrální okruh pluripotence. Zobrazené signální dráhy aktivují geny pluripotence a zároveň mají spolu s nimi roli v inhibici diferenciace. Převzato z Hyslop et al. (2005). PI3K/AKT dráha zmíněná dříve v souvislosti s mESCs je u hESCs aktivována bFGF. Publikována byla její aktivace u primátů ESCs (Watanabe et al. 2006).

Expresce centrálních genů pluripotence je v mESCs aktivována LIF. LIF aktivuje přes GP130/LIFR receptor paralelně více signálních drah. Aktivace JAK/STAT3 a PI3K/AKT dráhy vede k aktivaci genů pluripotence, naopak současná aktivace MAPK dráhy aktivaci těchto genů blokuje a působí prodiferenční (Niwa et al. 2009, obrázek 4). Tato situace, kdy LIF vede k vyvažování pro- a proti- diferenční signálů v mESCs má za následek výkyvy v hladinách centrálních genů pluripotence vlivem zpoždění ve zpětné vazbě. Výkyvy v hladinách genů pluripotence se mohou přenést na další geny. V rámci populace mESCs tak přechodně existují subpopulace buněk s různou stabilitou stavu pluripotence a tendencí k diferenciaci. Výkyvům podléhají právě hladiny proteinů, které jsou markery PGCs a jsou spojovány se schopností mESCs diferencovat do zárodečné linie *in vivo* v rámci chimér. Jsou to PRDM14, REX1, NANOG a STELLA (Grabole et al. 2013, Hayashi et al. 2008,

Chambers et al. 2007, Toyooka et al. 2008). Díky výkyvům v transkripci těchto genů v populaci buněk dokážou mESCs v přítomnosti LIF udržovat transientní subpopulace buněk schopné diferencovat do zárodečné linie a zároveň subpopulace, které jsou expresním profilem bližší pozdnímu epiblastu a zajistí diferenciaci do ostatních tkání tří zárodečných vrstev. Tento mechanismus transkripční fluktuace umožňuje mESCs zachování sebeobnovy a zároveň schopnost rychlé reakce na diferenciační signály různé povahy. Heterogenita v populaci mESCs vzniká také autorepresivní zpětnou vazbou NANOG. Zvýšená hladina NANOG je spojená se stabilním stavem pluripotence a schopností buněk diferencovat *in vivo* do zárodečné linie chimér. Zpětnovazebné snížení jeho hladiny vede k větší náchylnosti buněk k diferenciaci (Navarro et al. 2012).

Populace hESCs také vykazují fluktuace v expresi některých genů, například v genech WNT signální dráhy. WNT signalizace je důležitá pro sebeobnovu lidských i myších ESC (Sato et al. 2004). U hESC byly závěry ohledně vlivu WNT dráhy na jejich sebeobnovu nejednoznačné (Cai et al. 2007, Davidson et al. 2012, Dravid et al. 2005). Tato neshoda byla dána pravděpodobně heterogenitou v expresi WNT v rámci populace hESCs. Blauwkamp et al. (2012) ukazuje, že heterogenita v aktivaci WNT signalizace může mít roli v diferenciaci hESCs do buněk různých zárodečných vrstev. Buňky se zvýšenou WNT signalizací mají tendenci diferencovat do neuroektodermu.

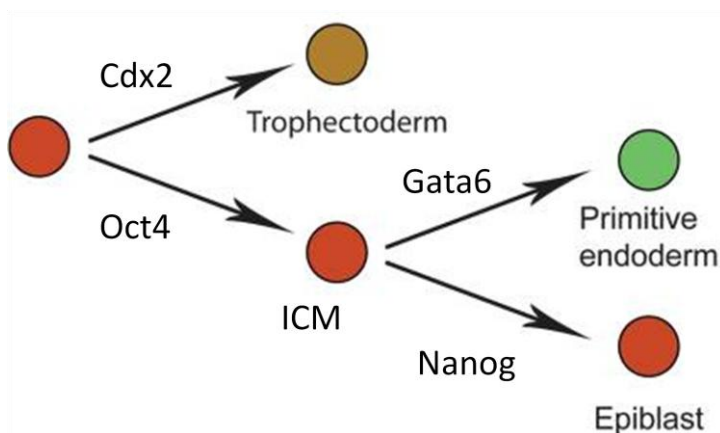
Heterogenita exprese v populacích ESCs zdá být obecným mechanismem, který vede k sebeobnově ESCs a zároveň zachovává jejich schopnost rychlé reakce na diferenciační signály. Rozdíl je právě ve schopnosti mESCs zachovávat v přítomnosti LIF subpopulaci buněk schopnou diferencovat do zárodečné linie. HESCs zachovávají heterogenitu převážně buněk nakročených do různých somatických linií.

V souladu s rolí LIF ve vytváření heterogenity v populacích mESCs má použití inhibitorů GSK3 CHIR90021 a MEK/ERK PD0325901 u mESCs za následek dovedení všech buněk do stavu REX1+ a STELLA+ a udržování tohoto stavu bez přítomnosti LIF. Přitom nejde o selekci buněk již REX1 a STELLA pozitivních (Silva et al. 2008b). Je rovněž možné izolovat naivní hESCs v 2i podmínkách s LIF. Izolace ICM v těchto podmínkách stabilizuje jinak velmi nestabilní stav naivní pluripotence a nedovolí diferenciaci naivních hESCs do stabilnějšího stavu nakročené pluripotence. Pokud ale chceme přeprogramovat do naivního stavu již izolované hESCs, je potřeba ektopická exprese *Klf4* (Guo et al. 2009). *Klf4* je jedním z genů, jehož exprese je snížena u mEpiSCs oproti mESCs. Dalšími takovými geny jsou *Stella*, *Rex1* nebo *Nanog*. Hladina OCT4 je naopak mírně zvýšená (Guo et al. 2009). MESC mají jedinečnou schopnost vytvářet v 2i podmínkách kultivace základní stav

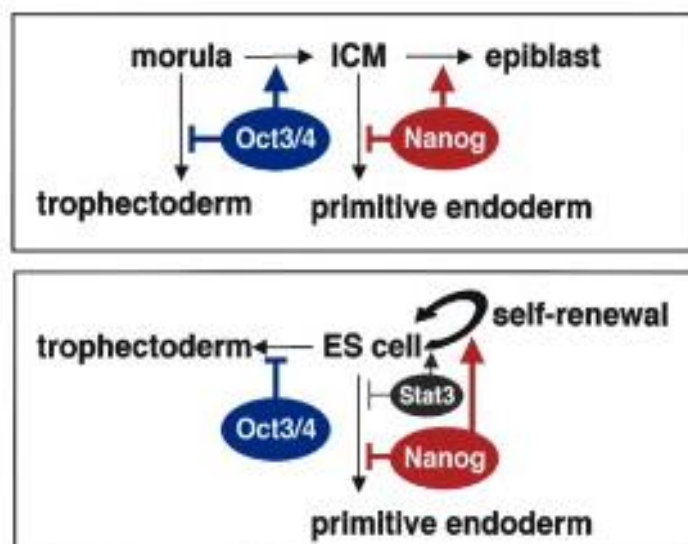
pluripotence (anglicky *ground state*). ESCs v tomto stavu nepotřebují vnější stimulaci LIF k udržení sebeobnovy pokud jsou inhibovány diferenciační signály MAPK dráhy.

#### 4.1.7. Geny pluripotence v raném embryonálním vývoji

Role transkripčních faktorů OCT4, SOX2 a NANOG v sebeobnově pluripotentních ESCs *in vitro* vychází z jejich role ve specifikaci pluripotentní ICM a epiblastu v raném embryonálním vývoji. První diferenciační událostí v raném embryonálním vývoji je oddělení buněk ICM, které jsou vymezeny expresí OCT4, a buněk TE, které exprimují CDX2 (Niwa et al. 2005). SOX2 je v ICM koexprimován s OCT4 (Avilion et al. 2003). NANOG hraje roli později, během diferenciace ICM na pluripotentní buňky epiblastu nebo PE. Populace buněk exprimující NANOG vytváří epiblast (Mitsui et al. 2003), naopak exprese GATA-6 vymezuje populaci buněk primitivního entodermu (Morrissey et al. 1998). Embryonální kmenové buňky jsou z myši izolovány nejčastěji v momentě přechodu ICM do epiblastu, kdy ICM tvoří populaci OCT4 a NANOG pozitivních buněk. Diferenciační události v raném embryonálním vývoji jsou znázorněny na obrázku 6.



**Obrázek 6:** Obrázek schematicky zobrazuje transkripční faktory vymezující populace buněk během raného embryonálního vývoje myši. Upraveno podle Kuijk et al. (2011).



**Obrázek 7:** Obrázek porovnávající roli OCT4 a NANOG ve specifikaci myší ICM a epiblastu *in vivo* (nahore) a v sebeobnově a inhibici diferenciace mESCs *in vitro* (dole). Obrázek byl převzat z práce Mitsui et al. (2003).

## 4.2. Indukované pluripotentní kmenové buňky

Indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSCs) byly poprvé připraveny v roce 2006 (Takahashi a Yamanaka 2006) vnesením čtyř transkripčních faktorů do kožních fibroblastů virovými vektory a kultivací těchto buněk v podmínkách specifických pro embryonální kmenové buňky (ESCs). K přeprogramování buněk byly použity geny pro transkripční faktory (TFs) OCT4, SOX2, KLF4 a c-MYC (OSKM). Tyto TFs mají funkci v sebeobnově a udržování stavu pluripotence. Zároveň jsou schopné indukovat v infikovaných buňkách globální i lokální epigenetické změny vedoucí k přeprogramování transkriptomu diferencované buňky do pluripotentního stavu. Stejnou metodou za použití jiné kombinace TFs (OCT4, SOX2, LIN28 a NANOG) byly vytvořeny i lidské iPS buňky (Yu et al. 2007). IPS buňky jsou funkčně rovnocenné ESCs. Správně přeprogramované iPS buňky splňují všechna kritéria pluripotence popsaná u ESCs. Do kvality přeprogramování se promítají rozdíly v genetické výbavě savčích druhů, které mají vliv i na izolaci ESCs.

IPSCs jsou podobně jako ESCs nástrojem pro výzkum raného embryonálního vývoje a mohou být jejich náhradou u druhů, kde se zatím nepodařilo stabilní linie ESCs vytvořit. Zároveň iPS technologie otevřela dveře k individualizované medicíně a vytváření *in vitro* modelů lidských nemocí a testování léčiv na individuálních liniích vytvořených z pacientů. Díky objevu iPSCs není potřeba pro některé výzkumné účely dále používat lidská embrya



a oocyty, které jsou potřeba pro ostatní metody vytváření pluripotentních kmenových buněk (shrnutí v Ellis a Bhatia 2011, Grskovic et al. 2011).

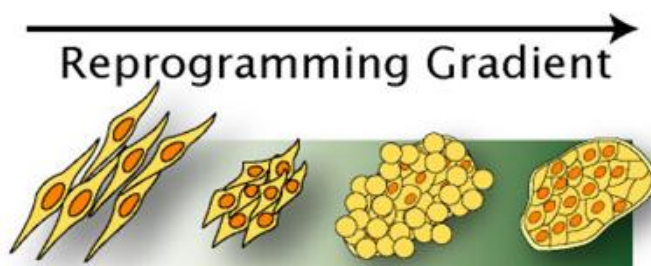
#### **4.2.1. Proces epigenetického přeprogramování somatických buněk**

Přes úspěšné zavedení metody přeprogramování somatických buněk na iPS buňky nebyl dlouho znám mechanismus tohoto procesu. Kvůli nízké účinnosti procesu přeprogramování se spekulovalo o tom, jestli iPS buňky nevznikají pouze z tkáňových kmenových buněk, které se v malém množství nachází v populacích primárních buněk. Později bylo ukázáno, že procesem epigenetického přeprogramování, který vede k vytvoření iPS buněk může úspěšně projít každá buňka, včetně terminálně diferencovaných B buněk (Hanna et al. 2008). Proces přeprogramování somatických buněk do stavu pluripotence je stochastickým neboli náhodným procesem, během kterého musí buňka na cestě ke stavu pluripotence překonat několik epigenetických bariér. Pravděpodobnost jejich překonání se zvyšuje s počtem dělení, kterými buňka projde. Proces přeprogramování ve shodě s touto teorií lze urychlit právě vnesením transkripčních faktorů, které zrychlují průběh buněčným cyklem a zvýší tak pravděpodobnost překonání epigenetické bariéry. Zvýšit rychlost procesu přeprogramování lze i použitím malých inhibičních molekul, které obecně otevírají chromatin a aktivují transkripci nebo inhibují konkrétní dráhy vedoucí k diferenciaci. Účinnost přeprogramování by přitom mohla být vnímána spíše jako schopnost přeprogramování určitého procenta buněk za určitý čas než v absolutních hodnotách. Za konečně dlouhou dobu mohou teoreticky všechny buňky infikované danými TFs dosáhnout stavu pluripotence (Hanna et al. 2009b).

Celkově má vliv na účinnost přeprogramování více faktorů. Jsou jimi např. genetické dispozice. Účinnost tvorby iPS buněk se může mezi různými kmeny myši lišit až 20krát (Silva et al. 2008b). Také místo integrace vektoru hraje důležitou roli. Sekundární iPS buňky vytvořené z buněk chimerických myši nesoucích Doxycyklinem (Dox) indukovatelný vektor (buňky myši připravené z primárních iPS buněk mají integrovaný vektor v místě, které u primárního přeprogramování k tvorbě iPS buněk vedlo) tvoří iPS buňky s 20 – 50krát vyšší účinností (Wernig et al. 2008a). Vliv na průběh přeprogramování mají i somatické mutace buněk, např. vyřazení p53 z činnosti vede k zvýšení účinnosti přeprogramování (Kawamura et al. 2009, Utikal et al. 2009).

Buňky, které prochází procesem přeprogramování během přeměny do stavu pluripotence postupně aktivují endogenní geny pluripotence a naopak umlčují geny somatických buněk. S tímto procesem jsou spojené změny v metylaci chromatinu. Celkové snížení metylace

chromatinu a jeho otevření vede ke zvýšení transkripční aktivity. Remodelace chromatinu je spojená s demethylací DNA v promotorech genů pluripotence buněk (shrnutí v Djuric a Ellis 2010). Demethylace promotorů endogenních genů *Oct4* a *Nanog* je znakem správně přeprogramovaných buněk (Wernig et al. 2007). Naopak chromatin promotorů genů, které jsou spojeny s diferenciací do somatických linií, je u ESCs/iPSCs obsazen bivalentními doménami – značkami chromatinu, které obsahují aktivační i inhibiční modifikace. Takto označené geny jsou v ESCs a iPSCs neaktivní, ale jsou schopné rychlé aktivace transkripce v reakci na diferenciaci (Boué et al. 2010). Důležitým znakem dokončeného přeprogramování v iPS buňky je také umlčení exprese z retrovirových vektorů (Hotta a Ellis 2008).



**Obrázek 8:** Proces přeprogramování somatických buněk zahrnuje několik stadií, která odráží změny morfologie buněk. Exprese transkripčních faktorů a kultivační podmínky vedou nejdříve ke změně morfologie směrem k epiteliálnímu fenotypu a k těsnějším shlukům buněk. Přeprogramované buňky tvoří kolonie s hladkými okraji a těsně sbalenými buňkami s vysokým poměrem jádra k cytoplasmě. Obrázek je převzat z přehledného článku Djuric a Ellis (2010).

U různých výchozích typů buněk se proces přeprogramování liší, právě podle jejich stavu aktivace chromatinu, transkripční aktivity a schopnosti proliferace. U buněk, které nejsou epiteliálního typu, jako nejčastěji používané fibroblasty, je prvním krokem přeprogramování mesenchymálně-epiteliální transice (MET). MET je proces, během kterého jsou potlačeny mesenchymální geny a aktivovány epiteliální. Zásadní pro tuto část přeprogramování je změna v typu mezibuněčných spojení, která má za následek změny morfologie a ztrátu kontaktní inhibice buněk, která je nezbytným krokem pro vytvoření kompaktních kolonií iPS buněk (shrnutí v Polo a Hochedlinger 2010, Li et al. 2010a).

Během MET dochází ke snížení exprese fibronectinu a N-cadherinu a naopak je zvýšena exprese E-cadherinu. Důležitou roli v tomto procesu hrají BMP4 a TGF $\beta$  signalizace, které se vzájemně negativně ovlivňují prostřednictvím SMAD4 (Li et al. 2010a). Zatímco BMP4 v myších buňkách aktivuje microRNA (miRNA) 200 a 205, aktivátory epiteliálních genů, TGF $\beta$ 1 signalizace vede k opačnému procesu, zkráceně nazývanému EMT (Samavarchi-Tehrani et al. 2010). Naopak epiteliální buňky jako NSCs již MET procházet nemusí. Jejich přeprogramování je díky tomu rychlejší a účinnější (Silva et al. 2008b). NSCs jako embryonální buňky mají navíc vyšší proliferací potenciál (Pitman et al. 2004).

#### **4.2.2. Metody přípravy indukovaných pluripotentních kmenových buněk**

Klasickou metodou pro vnesení vektorů do buněk určených k přeprogramování jsou již zmíněné retrovirové nebo lentivirové vektory. Jsou metodou první volby, pokud chceme dosáhnout vysoké účinnosti přeprogramování, ale nejsou vhodné pro klinické aplikace iPS buněk z důvodu vnesení relativně velkého počtu inserčních mutací do genomu (zvláště pokud je každý gen nesen samostatným vektorem). Jejich dalším negativem je možná reaktivace retrovirové exprese během diferenciaci iPS buněk. Reaktivace virových vektorů může způsobit protivirovou imunitní odpověď pacienta nebo vznik nádoru vlivem onkogenů (c-Myc, Klf4, Lin28) proužitých pro přeprogramování (shrnutí v Madonna 2012, Mochiduki a Okita 2012).

S rozvojem možných aplikací iPSCs pro klinické účely jsou neustále vyvíjeny a zlepšovány nové metody přeprogramování, které nezahrnují použití retrovirů a/nebo integraci vektorů do genomu buněk. Mezi neintegrativními metodami se zdají být nejefektivnější mRNA (Mandal a Rossi 2013, Warren et al. 2010) a neintegrativní Sendai viry (Churko et al. 2013, Jin et al. 2012). Naopak použití episomálních plasmidových vektorů (Yu et al. 2009), adenovirů (Stadtfeld et al. 2008) miRNA (Miyoshi et al. 2011) nebo přímo rekombinantních proteinů (Zhou et al. 2009) je efektivní méně a nemá takový potenciál pro vytváření iPS buněk z pacientů.

iPSCs byly účinně vytvořeny také vnesením ESC-specifických miRNA na virových vektorech. Použití miRNA pro přeprogramování údajně snižuje riziko nádorové transformace vzniklých iPSCs (Kelley a Lin 2012).

Velmi rozšířeným se stalo použití malých inhibičních molekul, které jsou schopné zvýšit účinnost přeprogramování ostatními metodami nebo mohou účinnost přeprogramování zachovat při snížení počtu vnesených TFs. Pro účely přeprogramování somatických buněk do stavu pluripotence jsou používány malé molekuly s pozitivním vlivem na celkovou úroveň transkripce a otevření struktury chromatinu i inhibitory konkrétních signálních drah, které hrají roli v diferenciaci buněk. Použití sníženého počtu virových vektorů a jejich

nahrazení malými molekulami umožní zachování nebo zlepšení účinnosti a rychlosti přeprogramování, a zároveň zvýší potenciál použití iPSCs pro klinické účely (Shi et al. 2008a).

Další možností jak připravit iPS buňky vhodné pro klinické účely je použití transpozonů, které se do genomu integrují, ale lze je zpětně vystříhnout a nehrozí tak riziko vzniku nádoru během jejich diferenciaci nebo po transplantaci pacientovi. Takovými systémy jsou transpozony nebo virové vektory s LoxP místy využívající Cre rekombinaci (Chakraborty et al. 2013, Loh et al. 2012), Sleeping beauty transpozony (Grabundzija et al. 2013, Muenthaisong et al. 2012) nebo PiggyBac transpozony (Kaji et al. 2009, Woltjen et al. 2009). U tohoto typu vektorů je vhodné použít pro přeprogramování pouze jeden polycistronní vektor, který usnadní zpětné vystřížení (Shao et al. 2009). Zároveň je vhodné použít chemicky indukovatelnou expresi z těchto vektorů, protože na rozdíl od virových nejsou v přeprogramovaných buňkách přirozeně umlčovány (Tsukiyama et al. 2011).

S výhodou je možné kombinovat více přístupů k přeprogramování podle technických dispozic laboratoře (např. pro práci s viry), zvířecího modelu, výchozího buněčného typu a požadované robustnosti přeprogramování; a zvolit ten, který bude mít dostatečnou účinnost pro daný účel.

#### **4.2.2.1. Malé molekuly v procesu přeprogramování somatických buněk**

Od vytvoření prvních iPS buněk byla vytvořena řada nízkomolekulárních inhibitorů, které hrají roli v procesu přeprogramování somatických buněk a mohou ho výrazně zefektivnit. Výhodou jejich použití je již popsaná možnost snížit počet vnesených TFs (Li et al. 2011c, Shi et al. 2008a, Shi et al. 2008b).

Pro zvýšení účinnosti přeprogramování nebo snížení počtu transgenů při zachování stejné účinnosti jsou využívány jak méně specifické inhibitory obecně aktivující transkripci, tak malé molekuly které cílí konkrétní signální molekulu.

Mezi nesespecifické aktivátory transkripce patří různé inhibitory histondeacetyláz a DNA-methyltransferáz. Meissner et al. (2007) použili inhibitor DNA-methyltransferázy 1 (DNMT1) 5-Azacytidine (AZA), který buňkám v procesu přeprogramování usnadnil aktivaci genů pluripotence. Zároveň s jejich aktivací byly umlčeny virové transgeny. AZA má na přeprogramování buněk dvojitý efekt. Může urychlit proces přeprogramování a zároveň zvýšit jeho účinnost – zvýšit počet vzniklých pluripotentních kolonií za stejný čas (Meissner 2007). Skupině Mikkelsen et al. (2008) se podařilo po přidání AZA zvýšit počet přeprogramovaných kolonií čtyřikrát.

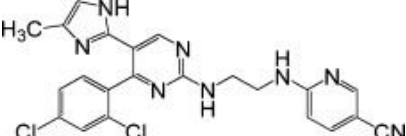
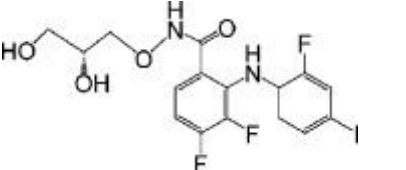
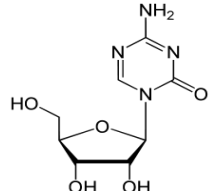
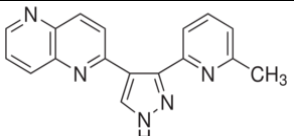
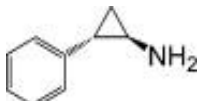
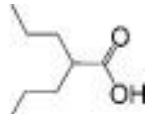
Molekulou často používanou společně s AZA je kyselina valproová (VPA), inhibitor histondeacetyláz (HDACs). VPA dokáže zvýšit účinnost přeprogramování somatických buněk až 50x oproti pouhé transdukci OSKM a 100x oproti transdukci OSK (Huangfu et al. 2008a). Kolonie v médiu s VPA a AZA také vzniknou průměrně o dva dny dříve než kontrolní (Huangfu et al. 2008a). Nevýhodou těchto inhibitorů je jejich nespecifita. Celkovou aktivací transkripce mohou vést buňky i k nádorové transformaci. Proto je potřeba omezit působení těchto inhibitorů na kratší časový úsek.

Další méně specifickou molekulou je Tranylcypromin (TR), inhibitor lysin specifické demethylázy 1 (LSD1) a monoaminoxidázy 1 (MAO-1). Tyto enzymy demetyluji methylované lysiny 4 na histonech 3 (H3K4), které jsou značkami aktivní transkripce na chromatinu v promotorech genů (Bernstein et al. 2005). TR byl schopen obecně zvýšit metylaci H3K4 a odblokovat transkripci v promotoru Oct4 u buněk linie zárodečného karcinomu P19 (Lee et al. 2006). Tranylcypromin byl využit ke zvýšení účinnosti přeprogramování fibroblastů infikovaných Oct4 a Klf4 spolu s inhibitorem GSK3 $\beta$  (Li et al. 2009a). MiR-302, jejíž ektopická exprese vede k přeprogramování somatických buněk, inhibuje mimo jiné právě LSD1. Výsledkem této inhibice bylo globální zvýšení demethylace genomu buněk a zvýšení účinnosti jejich přeprogramování (Lin et al. 2011). TR by měl mít účinek jak na obecnou demetylaci genomu, tak aktivační metylaci histonů. Měl by zprostředkovat dokončení procesu přeprogramování buňkám v pre-iPS stavu právě díky aktivaci transkripce *Oct4*, která povede k aktivaci dalších genů pluripotence a následně k nezávislosti na transgenní expresi.

Specifické účinky mají naopak inhibitory GSK3 $\beta$  (CHIR99021) a MEK/ERK (PD0325901) již byly zmíněny dříve v textu jako 2i podmínky kultivace, které jsou schopné dovést ESCs i iPSCs do naivního stavu pluripotence (Silva et al. 2008b). Tyto dva specifické inhibitory jsou často používány v konečné fázi přeprogramování nebo pro izolaci ESCs z nepermisivních druhů. MEK/ERK jsou součástí MAPK signální dráhy, která vede k sebeobnově hESCs a mEpiSCs, ale k diferenciaci mESCs. (Kunath et al. 2007, Tesar et al. 2007). Inhibice GSK3 $\beta$  má za následek aktivaci WNT signální dráhy, která hraje roli v proliferaci buněk, regulaci genů pluripotence a umožnila vytvoření iPSCs se sníženým počtem TFs, bez c-MYC (Marson et al. 2008).

Specifický účinek má i RepSox, který je inhibitorem TGF $\beta$ /Activin/Nodal signalizace, konkrétně ALK5 receptoru. Byl použit pro přeprogramování lidských iPSCs bez SOX2 a c-MYC (Maherali a Hochedlinger 2009, Ichida et al. 2009). TGF $\beta$  signalizace udržuje sebeobnovu epiblastových kmenových buněk (James et al. 2005, Tesar et al. 2007), ale zároveň hraje roli v diferenciaci buněk (Massagué a Xi 2012). Inhibice ALK5 může pomoci

udržet piPSCs v naivním stavu pluripotence, zároveň může mít pozitivní vliv na průběh MET díky aktivaci BMP4 v buňkách s inhibicí ALK5 (Grönroos et al. 2012, Tojo et al. 2005). V tomto textu byly popsány účinky molekul, které autorka použila pro přeprogramování prasečích somatických buněk. Více se této problematice věnuje přehledný článek Feng et al. (2009). Chemická struktura a účinky jednotlivých malých molekul jsou shrnuty v tabulce 1.

Sloučenina	Název	Cílová molekula	Účinky
	CHIR99021	GSK3 $\beta$	Aktivuje Wnt signalizaci, podpora sebeobnovy pluripotentních buněk (Ying et al. 2008, Li et al. 2009b)
	PD0325901	MEK/ERK	Blokuje diferenciaci a podporuje udržení základního stavu pluripotence (Ying et al. 2008)
	5-Azacytidine	DNMT1	Dokončení procesu přeprogramování, aktivace promotorů genů pluripotence (Meissner et al. 2007, Mikkelsen et al. 2008)
	RepSox	ALK5	Nahradí Sox2 a c-myc při přeprogramování fibroblastů (Baker et al. 2009, Ichida et al. 2009)
	Tranylpromin (Parnate)	MOA-1, LSD1	Zvýší H3K4 metylaci (Lee et al. 2006). Umožní přeprogramování lidských keratinocytů pomocí Oct4 a Klf4 (Li et al. 2009a)
	Kyselina valproová	HDACs	Umožní přeprogramování fibroblastů pomocí Oct4 a Sox2, zvyšuje účinnost přeprogramování s OSKM až 100x (Huangfu et al. 2008b)

**Tabulka 1:** Malé molekuly použité v ESC médiu pro přeprogramování pNSCs a PEFs. Tabulka byla inspirována tabulkami v přehledných článcích (Feng et al. 2009, Li et al. 2010b).

### 4.3. Pluripotentní buňky prasete

#### 4.3.1. Pluripotence u prasat v raném embryonálním vývoji

Podobně jako u ostatních savců, vzniká v raném embryonálním vývoji prasete blastocysta tvořená ICM a TE. Buňky ICM diferencují do epiblastu a hypoblastu. Na rozdíl od myšího nebo lidského raného embryonálního vývoje u prasete OCT4 nevymezuje ve stadiu rané blastocysty ICM, ale je exprimován i TE spolu s CDX2. U prasat tedy nedochází k segregaci exprese OCT4 a CDX2, na rozdíl od myši, během první diferenciaci embrya. Navíc ICM, která je u prasečího embrya přítomná mezi E 5.5 a E 7.5, neexprimuje NANOG ani SOX2, které jsou důležité pro pluripotenci buněk vnitřní buněčné masy, ani další geny spojené s pluripotencí s výjimkou nízké exprese c-MYC (Hall 2012).

Jiná studie ukazuje, že NANOG se objevuje jako první od E 7.5 pouze v ICM a následně v epiblastu mezi E 9.5 a E 10.5 (du Puy et al. 2011). Exprese OCT4 není ale v tomto období ještě specifická pro ICM. Později po segregaci epiblastu (E 9.5) je již OCT4 přítomen pouze v této populaci buněk společně s Nanog (Wolf et al. 2011a). Právě buňky, kde je společně exprimován NANOG i OCT4 jsou u myši i člověka nejvhodnějšími pro izolaci ESCs a selekci iPSCs (Wernig et al. 2007). Dá se tedy předpokládat, že nejvhodnějším momentem pro izolaci prasečích pluripotentních kmenových buněk je právě E 9.5 – E 10.5. Toto stadium může dát vznik epiblastovým kmenovým buňkám (EpiSCs), které se již u prasete podařilo izolovat a vytvořit stabilní linii pEpiSCs (Alberio et al. 2010, Park et al. 2013).

Z posledních prací se zdá, že ICM je u prasete spíše pasivní populací buněk, kde nejsou exprimovány téměř žádné proteiny dosud spojované s pluripotencí mimo c-MYC a OCT4, který je přítomen i v TE (Hall 2012). Až stadium epiblastu je charakteristické receptory FGF, BMP a WNT dráhy, GP130 receptoru a STAT3, ale nikoli LIFR, který je exprimován pouze buňkami TE. LIFR je potřeba spolu s GP130 pro přenos LIF signálu do buňky a fosforylaci STAT3. STAT3 je tedy pravděpodobně v buňkách epiblastu prasete aktivován jiným cytokinem (autoři uvádí IL-6 jako možného kandidáta) (Hall 2012). V souladu s tím se zdají pro izolaci a sebeobnovu pESCů vhodnější kultivační podmínky s bFGF a podpůrnými buňkami.

Prasečí ICM je velmi transientní a nestabilní stadium v prasečím raném embryonálním vývoji. Problémem z hlediska vytvoření pluripotentních ESCs z tohoto stadia blastocysty je nedostatečná aktivace genů pluripotence a odlišné načasování ve vymezení pluripotentní populace buněk prasete. Na rozdíl od lidských ESCs kultivace buněk izolovaných z ICM

prasete nevede k jejich transici do stavu nakročené pluripotence odpovídající pozdnímu epiblastu, pravděpodobně právě kvůli nepřítomnosti FGFR v buňkách ICM prasete (Hall 2012).

ES-like buňky izolované a kultivované v klasických podmínkách s bFGF nejsou schopné dlouhodobější sebeobnovy ve stavu pluripotence (Blomberg et al. 2008, Li et al. 2003, Wolf et al. 2011b). Pouze výjimečně byla zachována sebeobnova pESCs během více než 10 pasáží v podmínkách s bFGF (Brevini et al. 2007, shrnuto v Vackova et al. 2007, Vassiliev et al. 2011). LIF je schopen podporovat sebeobnovu ES-like buněk izolovaných z prasečí ICM, pokud jsou použity 2i/LIF podmínky kultivace. Prasečí ES-like buňky kultivované v těchto podmínkách exprimovaly LIFR i GP130 receptory (Haraguchi et al. 2012), jejich pluripotence ale byla omezena na úkor schopnosti sebeobnovy. Stabilní linii pluripotentních kmenových buněk (PSCs) z prasečí blastocysty se podařilo vytvořit pouze vnesením vektorů s *OCT4* a *KLF4*. Přitom vnesení pouze *KLF4* nebylo dostatečné pro dosažení stavu pluripotence. Vytvořené iES-like buňky pak byly stabilně kultivovány v nediferencovaném stavu v 2i/LIF podmínkách. Zároveň byly schopné diferenciace a tvorby teratomů (Telugu et al. 2011). Tato studie potvrzuje neschopnost buněk prasečí ICM dostatečně aktivovat geny pluripotence a potřebu jejich zvýšené exprese pro stabilitu stavu pluripotence u prasat.

#### 4.3.2. Prasečí indukované pluripotentní kmenové buňky

Vhodnou alternativou k pESCs jsou prasečí iPS buňky (piPSCs), které se podařilo poprvé vytvořit před několika lety třem skupinám současně (Esteban et al. 2009, Ezashi et al. 2009, Wu et al. 2009). Linie prasečích piPSCs vytvořené retrovirovými nebo lentivirovými vektory s kanonickou kombinací TFs OSKM byly kultivovány v podmínkách s bFGF na podpůrných buňkách. Kolonie takto vytvořených piPSCs měly plochou morfologii, kterou připomínaly lidské ESCs a nízkou klonogenicitu. PiPSCs uvedených tří skupin vykazovaly expresi markerů pluripotence a schopnost diferenciace *in vitro* i *in vivo*, přesto nejsou zcela přeprogramovanými iPS buňkami. Nedošlo u nich k umlčení transgenní exprese vlivem nedostatečné aktivace vlastních genů pluripotence a jsou na transgenní expresi závislé. PiPSCs vytvořené pomocí chemicky indukovatelných vektorů po odstranění chemické indukce diferencovaly (Wu et al. 2009). Problém nedostatečné aktivace genů pluripotence je tak společný prasečím ESCs i iPSCs. Jedná se o buňky, které se zastavily v pre-iPS stavu, v jejich případě nevedla k účinnějšímu přeprogramování buněk než 2i podmínky kultivace.

Inhibice H3K4 demetylace Translucyprominem zatím nebyla vyzkoušena pro přeprogramování prasečích buněk. Jeho potenciál aktivovat transkripci *OCT4* by mohl pomoci vytvořit piPSCs nezávislé na transgenech. Výhodou těchto malých molekul



pro přeprogramování prasečích iPS buněk je, že aktivují přímo endogenní geny pluripotence. Mohou tak vést snadněji k úplnému přeprogramování prasečích buněk a k jejich nezávislosti na transgenní expresi.

Zůstává tu ale možnost, že genetické dispozice většiny plemen prasat nejsou příhodné pro dlouhodobou sebeobnovu ve stavu naivní pluripotence bez pomocné exprese transgenů. Centrální okruh pluripotence možná není schopen dostatečné aktivace klíčových genů pro dlouhodobé udržení stavu pluripotence nezávisle na kultivačních podmínkách. Naivní pluripotentci jsem tak u prasečích PSCs nazývala spíše jejich závislost na LIF a morfologickou podobnost mESCs než naivní vývojový potenciál.

#### **4.3.2.1. Vliv malých molekul na dosažení stavu naivní pluripotence piPSCs**

Pro dovedení prasečích iPS buněk do stavu naivní pluripotence jsou podle předpokladů potřeba podmínky kultivace s malými molekulami, které povedou k otevření struktury chromatinu, demetylacii genomu a stabilizaci stavu pluripotence. Z nespecifických aktivátorů transkripce byla pro vytvoření piPSCs použita VPA, která vedla ke zvýšení účinnosti přeprogramování v podmínkách s bFGF + LIF (Cheng et al. 2012). Vznikly tak ploché i vystouplé 3D kolonie. Charakterizované 3D kolonie byly závislé na LIF (zvýšená exprese LIFR), a po zablokování JAK ztratily morfologii a snížily expresi genů pluripotence (Cheng et al. 2012). Zároveň u několika klonů piPSCs došlo k umlčení transgenní exprese. Tyto linie piPSCs byly schopné přispět k tvorbě chimér na úrovni blastocysty, chiméry ale nebyly transplantovány náhradním matkám a nebyl testován jejich další vývoj. U jiných linií iPSCs se umlčení retrovirových vektorů potvrdit nepodařilo. Malé molekuly obecně zvyšující transkripční aktivitu by tedy měly mít zásadní vliv na schopnost piPSCs dosáhnout stavu naivní pluripotence nezávislém na transgenní expresi.

VPA byla použita i pro vytvoření naivních piPSCs závislých na LIF spolu s 2i kombinací inhibitorů (Telugu et al. 2010). Přeprogramované iPS kolonie nedokázaly zpočátku udržet morfologii naivních iPS buněk a byl proto po několik dní kultivovány v AZA, který vedl ke stabilizaci 3D morfologie kolonií. Tyto kolonie bylo možné pasážovat jako jednobuněčnou suspenzi, stejně jako mESC/miPSCs. Bohužel tyto piPSCs vytvořené vnesením episomálních vektorů nebyly schopné vektory vyředit a u některých klonů byly vektory dokonce integrovány do genomu (Telugu et al. 2010). Schopnost těchto piPSCs tvořit chiméry nebyla v publikaci popsána. Další práce vedla při použití 2i/(3i)/LIF podmínek kultivace k vytvoření naivních piPSCs se zvýšenou expresí STELLA a REX1, markery pluripotence naivních mESCs. Tyto linie ale také nedokázaly umlčet transgenní

expresi. Autoři ukazují zvýšenou diferenciaci těchto buněk do zárodečné linie pouze *in vitro*, (Rodriguez et al. 2012).

Studie opakovaně potvrzují potenciál 2i/(3i)/LIF inhibičních podmínek indukovat v prasečích buňkách spolu s OSKM stav naivní pluripotence. Bohužel ani piPSCs ve stavu naivní pluripotence nejsou ve většině případů schopné dostatečně aktivovat geny pluripotence a jsou závislé na aktivní transgenní expresi. Podobně při pokusech vytvořit stabilní linie pluripotentních buněk z ICM byl úspěšný pouze pokus, kde byly vneseny *OCT4* a *KLF4* do buněk ICM (Telugu et al. 2011).

#### 4.3.2.2. Tvorba chimér z piPSCs

Fan et al. (2013) testovali různé linie prasečích iPSCs s ohledem na jejich ve kterém často uvízne velká část kolonií během přeprogramování (Silva et al. 2008b).

Jako neúplně přeprogramované se ukázaly být i první vytvořené miPSCs (Takahashi a Yamanaka 2006). Znaky takových buněk byly mimo morfologické podobnosti s ESCs neumlčení virových vektorů a neúplná demetylace, a tudíž nedostatečná aktivace, promotorů endogenních *Oct4* a *Nanog*. Důsledkem nedostatečné aktivace genů pluripotence byla mimo jiné neschopnost těchto iPSCs tvořit chiméry. První miPSCs vytvořené Takahasim a Yamanakou byly selektovány na základě aktivace promotoru genu *Fbx15* (gen aktivovaný OCT4). Wernig et. al (2007) použili jako selekční znak myších iPS kolonií aktivitu promotoru genů *Nanog* nebo *Oct4*. *Oct4* se ukázal jako spolehlivější, vyšší procento OCT4+ kolonií bylo schopno tvořit chiméry. Potvrdili také, že selekce iPS buněk na základě morfologie může vést k selekci kolonií, které ještě nedokončily přechod po stavu pluripotence. Řešením je vytvoření reportérového systému pro monitorování aktivace některého z genů pluripotence během přeprogramování u prasat (Huang et al. 2011, Nowak-Imialek et al. 2011).

Proto je potřeba vyzkoušet potenciál malých molekul, které mají schopnost aktivovat konkrétní geny pluripotence. Jednou z nich je RepSox, inhibitor ALK5 receptoru TGFβ rodiny. Důsledkem působení RepSox během přeprogramování lidských iPS buněk byla aktivace *NANOG*, která dokázala nahradit použití *SOX2* pro přeprogramování (Maherali a Hochedlinger 2009). Telugu et al. (2010) použili jiný inhibitor ALK5 (A-83-01) spolu s 2i a Kenpaullonem (inhibitorem CDK1/cyklinu B) pro vytvoření piPSCs, tato kombinace schopnost tvořit chimerická prasata metodou přenosu jádra (somatické, ale v tomto případě iPS) buňky do oocyty zbaveného jádra (SCNT, somatic cell nuclear transfer).

K úspěšné tvorbě chimér na úrovni embryonálního vývoje vedly iPSCs, které před použitím pro klonování prošly diferenciací nebo ošetřením inhibitorem HDACs Scriptaid. Diferenciace piPSCs vedla ke snížení exprese transgenů pouze u linií piPSCs, pro jejichž

vytvoření byly použity chemicky indukovatelné vektory (Wu et al. 2009). Pouze jedna linie piPSCs s chemickou indukcí exprese transgenů vedla k narození šesti chimerických prasat, dvou z iPSCs diferencovaných před SCNT, čtyř z iPSCs ošetřených inhibitory HDACs. Všechna prasata do měsíce zemřela, u SCNT je relativně vysoká mortalita klonovaných prasat častá (Kurome et al. 2013). Tato studie potvrzuje, že aktivní transgenní exprese a nedostatečná acetylace histonů (otevření chromatinu) jsou faktory negativně ovlivňující tvorbu chimér z piPSCs. Chemicky indukovatelné vektory a použití inhibitorů HDACs mohou vést ke zvýšení účinnosti tvorby chimér z piPSCs. SCNT ale limituje účinnost procesu tvorby životaschopných chimér.

V kontrastu s předešlou studií práce West et al. (2010) ukazuje, že je možné z piPSCs vytvořit životaschopná chimerická prasata přes aktivní expresi vnesených transgenů. PiPSCs byly připraveny vnesením 6 TFs (OSKMNL) na retrovirových vektorech a kultivovány v podmínkách s bFGF. Tyto piPSCs dokázaly aktivovat endogenní *OCT4*, ale transgenní exprese zůstala také aktivní. Přesto, že piPSCs nebyly ve stavu naivní pluripotence část vytvořených chimér vykazovala chimerismus i v gonádách (5 z 10 testovaných) (West et al. 2010). To kontrastuje s předpokladem, že naivní iPSCs/ESCs by měly mít lepší schopnost tvořit chiméry s vyšší účinností a s přispěním k zárodečné linii. V souvislosti s použitými transgeny autoři spekulují, že dostatečně vysoká exprese *Nanog* by mohl být klíčovým faktorem, který vede k vytvoření piPSCs se schopností tvořit chiméry. Přenos chimerismu do zárodečné linie v této studii ale nebyl potvrzen. Zvýšení počtu TFs včetně použití *NANOG* může vést k efektivnějšímu přeprogramování piPSCs a může být důvodem vyšší účinnosti tvorby chimér. Diferenciace *in vitro* ale nevedla k umlčení transgenní exprese, proto lze předpokládat, že transgeny byly aktivní i během embryonálního vývoje chimér. Myší iPSCs izolované na základě aktivace promotoru *Nanog* byly také schopné tvořit chimerické myši na rozdíl od miPSCs selektovaných na základě aktivace promotoru *Fbx15* (Okita et al. 2007, Wernig et al. 2007).

Velkou roli ale mohou hrát také genetické faktory. Ukázkou jsou odlišnosti v expresi u linií piPSCs vytvořených z prasat odlišných plemen. PiPSCs vytvořené West et al. byly negativní nebo velmi slabě pozitivní pro oba tyto antigeny SSEA-4 i TRA 1-81, které jsou specifické pro lidské ESCs. Autoři před vytvořením chimér kultivovali piPSCs v definovaných podmínkách bez podpůrných buněk, které umožnily selektovat správně přeprogramované buňky

Schopnost ESCs/iPSCs tvořit chiméry je důležitým testem pluripotence *per se*, který je důkazem vytvoření iPSCs ve stavu naivní pluripotence analogických s myšími ESCs, které jsou jako jediné schopné robustní tvorby chimér s přenosem do zárodečné linie. V protikladu

k tomuto předpokladu se West et al. podařilo vytvořit chiméry s relativně vysokou účinností z piPSCs v nakročeném stavu pluripotence. Nebyla ale zhodnocena míra chimerismu v zárodečné linii u narozených prasat. Z praktického hlediska je tvorba chimér s přispěním k zárodečné linii důležitá pro vytváření transgenních zvířat pro chov nebo vytváření preklinických modelů nemocí pomocí genového knock-outu. Zatím je pro tyto účely využívána homologní rekombinace v somatických buňkách v kombinaci se značně neúčinnou SCNT.

Pro vytváření *in vitro* modelů nemocí je ale zásadní schopnost pluripotentních buněk diferencovat do specifických buněčných typů. PiPSCs které toto kritérium splní, jsou dostatečným nástrojem k tomuto účelu. Neumlčená transgenní exprese piPSCs může představovat problém i zde (Yu et al. 2007). Řešením mohou být nevirové vektory, které mají navíc chemicky regulovatelnou expresi nebo se dají zpětně vystříhnout (Chakraborty et al. 2013, Grabundzija et al. 2013, Merling et al. 2013, Woltjen et al. 2009, Yusa et al. 2009).

#### **4.3.3. Metody vhodné pro přeprogramování prasečích somatických buněk**

Z hlediska metod vhodných pro vytváření iPS buněk je situace u prasete trochu odlišná od situace u myši. Je dána tím, že dosud vytvořené prasečí iPS buňky nebyly schopné inaktivovat transgenní expresi z vnesených vektorů a zároveň dostatečně aktivovat vlastní geny pluripotence. Jsou na transgenní expresi závislé a vypnutí přepisu z transgenních promotorů vede k diferenciaci piPSCs (Wu et al. 2009). PiPSCs se sice podařilo vytvořit pomocí episomálních vektorů (Telugu et al. 2010), ale tyto vektory byly u izolovaných kolonií integrovány do genomu, což dále potvrzuje závislost piPSCs na přepisu genů pluripotence i po přeprogramování do pluripotentního stavu.

Proto pro vytvoření piPSC nepřichází v úvahu neintegrativní metody a zatím také nebylo publikováno úspěšné vytvoření piPSCs pomocí některé z dalších neintegrativních metod, například u myši účinné metody vnesení mRNA s TFs OSKM. Zatím byla ve většině prací pro přípravu piPSCs použita retrovirová metoda (Esteban et al. 2009, Ezashi et al. 2009, Wu et al. 2009), jedna práce ukazuje použití plasmidových integrativních polycistonních vektorů (Montserrat et al. 2011) a jedna skupina použila sleeping beauty transpozony (Kues et al. 2013).

Vhodným způsobem jak připravit piPSCs, které budou schopné diferenciaci do specifických linií (neuronů) a budou použitelné pro preklinický výzkum HD, mohou být integrativní transpozony s možností vystřížení. Vylepšením této metody by byla možnost indukovatelné exprese, která může zajistit regulované umlčení transgenní exprese před

diferenciací buněk a zároveň umožní testovat kultivační podmínky, ve kterých budou piPSCs schopné aktivovat vlastní geny pluripotence. Takové kultivační podmínky by měly zahrnovat právě malé molekuly, jejichž pozitivní účinek na přeprogramování byl ukázán u myších nebo lidských buněk. Prasečí somatické buňky se ve většině případů zastavily v pre-iPS stavu a nejsou schopné překonat methylační bariéru a aktivovat vlastní geny pluripotence.

Posledním důležitým hráčem je u nevirových metod přeprogramování metoda transfekce. Viry jsou adaptované pro infekci buněk, a proto je účinnost přenosu vektoru virovými metodami vysoká (kolem 80 %). Nevirové vektory musí být do buněk vneseny jinými metodami, které často tak účinné nejsou (různé druhy lipidových nebo proteinových transfekčních činidel) nebo je jejich účinnost vykoupená vysokou úmrtností buněk (elektroporace).

#### **4.3.3.1. MiRNA a indukovatelná exprese**

Je známo několik skupin miRNA, které hrají roli v pluripotenci ESCs a v procesu přeprogramování (Li et al. 2011a, Liao et al. 2011). Jednou ze skupin takových miRNA je miRNA klastr 302/367, který je specificky exprimován v ESCs a byl několika skupinami použit pro přeprogramování lidských nebo myších buněk (Anokye-Danso et al. 2011, Kuo et al. 2012). Skupina miRNA 302/367 má pozitivní vliv na průběh MET, průběh buněčného cyklu a aktivaci genů pluripotence (Lee et al. 2012, Liao et al. 2011, Subramanyam et al. 2011)

Pokud jsou do buněk za účelem přeprogramování vneseny samotné miRNA, není účinnost přeprogramování příliš vysoká (Miyoshi et al. 2011). Pokud jsou ale vneseny geny pro miRNA na virovém nebo jiném vektoru, může být přeprogramování účinnější než při použití OSKM. Výhodou miRNA pro přeprogramování je, že představují nižší riziko nádorové transformace iPSCs (Kelley a Lin 2012, Lin et al. 2010). Aby přeprogramování proběhlo úspěšně, musí být hladina miRNA přísně regulována. Příliš nízká hladina nevede k přeprogramování buněk, příliš vysoká hladina by mohla vést k jejich senescenci. Proto je vhodné v kombinaci s tímto přístupem pro přeprogramování použít vektor s chemicky indukovatelnou expresí, který takovou regulaci hladiny exprese umožní.

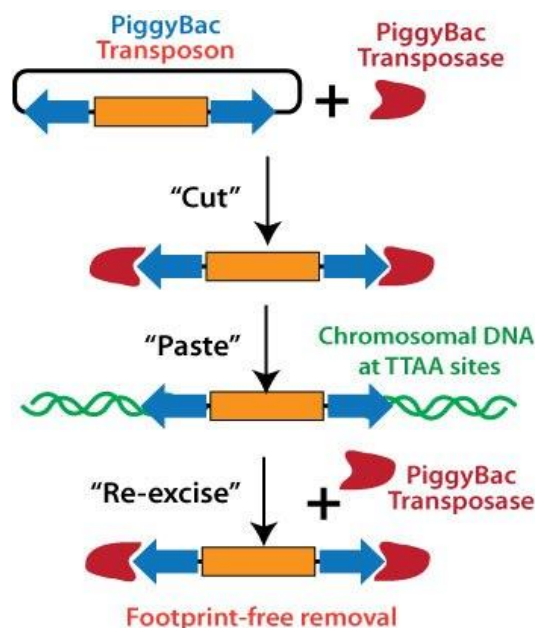
Jednou z možností indukovatelné exprese jsou vektory řízené Cumate. Vektor nesoucí Cumate operon má v klidovém stavu bez přítomnosti Cumate navázaný represor. Pokud je do média přidán Cumate v dostatečné koncentraci, naváže se na represor, který tak ztratí afinitu k operátoru. Cumate je planární (heterocyklická) molekula analogická hormonům a proniká přes buněčnou membránu přímo do jádra (Mullick et al. 2006). Další výhodou tohoto systému je možnost expresi úplně vypnout po přeprogramování buněk do stavu

pluripotence a testovat jejich závislost na transgenní expresi v různých kultivačních podmínkách.

#### **4.3.3.2. PiggyBac transpozice**

Vektory fungující na principu PiggyBac (PB) transpozice jsou dnes běžně používány pro transgenezi savčích buněk. Mohou do nich být vneseny transfekcí ve formě plasmidové DNA. Spolu s integrativními PB plasmidy jsou do buněk vneseny episomální plasmidy kodující PB transpozázu, která specificky rozpoznává TTAA sekvenci v koncových invertovaných repetitcích PB transpozonu, a systémem „cut and paste“ (vystříhnout a vložit) začlení transpozon do genomu cílové buňky (obrázek 9). Transpozáza je časem vyředěna, takže PB transpozon zůstane s určitou pravděpodobností do genomu trvale začleněn. Výhodou těchto transpozonů je, že mohou nést delší sekvence než retrovirové nebo lentivirové vektory. Schopnost transpozice PB transpozonu neklesá, ani pokud vložená sekvence dosahuje délky 14,3 Kb (Li et al. 2011b).

Zásadní pro účinnost transpozice je poměr expresního vektoru a transpozázy. Množství expresního vektoru musí být alespoň dvakrát vyšší než množství transpozázy aby účinnost transpozice nebyla snížena (Wu et al. 2006). PiggyBac transpozony zajišťují stabilní a dlouhodobou expresi, která je důležitá pro přeprogramování somatických buněk do iPSCs. Výhodou pro vytváření iPSCs pomocí PB transpozonů je možnost jejich opětovného vystřížení z genomu. Opětovným vnesením PB transpozázy do buněk je možné PB transpozony odstranit bez zanechání stopy (Wu et al. 2006). PiggyBac vektory již byly úspěšně použity pro přípravu lidských a myších iPSCs (Woltjen et al. 2009, Yusa et al. 2009) a následného vystřížení vektoru u myších iPSCs (Yusa et al. 2009).



**Obrázek 9:** Obrázek zjednodušeně znázorňuje mechanismus začlenění PB kazety do genomu a její opětovné vystřížení. Převzato z [http://www.biocat.com/cgi-bin/page/sub1.pl?main\\_group=genomics&sub1=piggybac\\_transposon\\_system](http://www.biocat.com/cgi-bin/page/sub1.pl?main_group=genomics&sub1=piggybac_transposon_system).

#### 4.3.3.3. Nukleofekce

Nukleofekce je metodou založenou na elektroporaci. Díky jejímu vylepšení se vektory dostanou přímo do jádra buňky a mohou být ihned exprimovány. Nukleofekce tak odstraňuje bariéru, kterou je pro vektory jaderná membrána a včlenění vektoru do genomu buňky může proběhnout bez rozdělení buňky. Zároveň přímé vnesení vektoru do jádra vede k dřívějšímu zahájení exprese.

Použití virových vektorů vyvolává v buňkách protivirovou imunitní reakci. Tato reakce zahrnuje aktivaci tvorby volných radikálů, oxidativní poškození DNA, aktivaci proapoptického p53 a k následné zvýšené senescenci nebo apoptoze buněk. Tento jev je časnou bariérou v procesu preprogramování, která může jeho účinnost snižovat, přes vysokou účinnost infekce buněk virovými vektory. U nukleofekce nebyla takováto imunitní reakce zaznamenána (Mah et al. 2011). Je ale třeba zmínit, že elektrický puls, který je podstatou nukleofekce může způsobovat zlomy v DNA, přesto že není publikace, která by takové negativní efekty nukleofekce popisovala.

Nukleofekce je velmi vhodná pro obtížně transfekovatelné typy buněk, včetně terminálně diferencovaných neuronů. Metoda nukleofekce má předdefinovaný profil elektrického pulsu v kombinaci s vhodným nukleofekčním činidlem pro většinu typů buněk, pro některé buněčné typy byly protokoly dále optimalizovány, včetně námi používaných nervových

kmenových buňek (Bertram et al. 2011). Nukleofekce již byla úspěšně použita pro vnesení episomálních vektorů a přeprogramování prasečích embryonálních fibroblastů (Telugu et al. 2010).

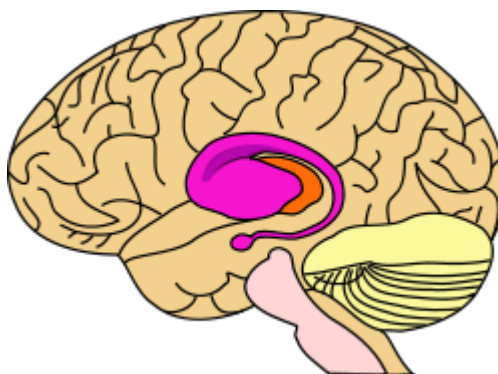
#### 4.4. Huntingtonova choroba

Huntingtonova choroba (HD) je neurodegenerativní onemocnění způsobené prodloužením CAG repetice (kódující polyglutamin) v exonu 1 genu *IT15* (*HTT*) kodujícího protein huntingtin. Gen *IT15* se nachází na krátkém raménku chromosomu 4. HD je děděna autozomálně dominantním způsobem a je v současné době neléčitelnou nemocí. HD propukne vždy, pokud má CAG repetice 40 a více opakování. Nemoc má dlouhou latentní fázi a objevuje se zpravidla v pozdějším věku, běžně mezi 35. a 50. rokem života. S rostoucí délkou zděděné CAG repetice se snižuje věk prvních klinických projevů nemoci. Od prvních klinických příznaků se doba dožití pohybuje mezi 10 – 15 lety (Zuccato et al. 2010). Přes velký pokrok v poznání mechanismů patogeneze HD a ve vývoji možných léčiv není v současné době pacientům dostupná léčba, která by dokázala zpomalit průběh nemoci (Clabough 2013). K dispozici mají pacienti pouze léky zmírňující některé z projevů nemoci.

Nejčastějšími projevy HD jsou poruchy motoriky bradykinesia (Berardelli et al. 2001), dystonia (Becker et al. 2007), nekontrolované mimovolní pohyby, známé jako chorea, změny osobnosti, deprese a demence. Obecně lze průběh nemoci zjednodušit na postupné fyzické a psychické chátrání organismu. To je způsobené v časných fázích odumíráním projekčních neuronů striata (obrázek 10), které jsou nejcitlivější k mHtt. Následuje degenerace neuronů v dalších oblastech kortexu a atrofie postižených oblastí mozku [shrnuto v (Gil a Rego 2008, Zuccato et al. 2010)].

Huntingtin je přepisován ve všech tkáních, nejen v nervových, které jsou nemocí nejvíce postiženy (jsou popsány 2 formy HTT, které se liší výskytem v různých tkáních). HTT interaguje s mnoha jinými proteiny a na buněčné úrovni hraje roli v metabolismu, apoptoze, dynamice mitochondrií, v axonálním transportu, autofagii a dalších procesech. HD je na buněčné úrovni způsobena získanou funkcí mutovaného huntingtinu (zvýšenou afinitou k interakčním partnerům, interakcí s jinými proteiny) i ztrátou funkce normálního huntingtinu (snížením množství wtHTT). Jedním z typických projevů choroby na histologické úrovni je tvorba shluků (agregátů) mHTT do kterých je začleněn i wtHTT a další proteiny. Shluky jsou tvořeny v cytoplazmě i v jádře. Odštěpená N-koncová část HTT obsahující polyglutaminový trakt má zvýšenou tendenci tvořit shluky. Tato část HTT proteinu je považována za hlavního nositele patogeneze [shrnuto v (Cattaneo et al. 2001, Cisbani a Cicchetti 2012, Ross a Tabrizi 2011)].





**Obrázek 10:** Striatum je součástí bazálních ganglií, oblátí šedé hmoty uvnitř hemisfér koncového mozku. Striatum se skládá z *nuclei caudati* a *putamen*, někdy je za součást striata považován i *globus pallidus*. Striatum se podílí na kontrole pohybu ale i exekutivních funkcí (Kreitzer a Malenka 2008). Obrázek je převzat z <http://en.wikipedia.org/wiki/Striatum>.

#### 4.4.1. Preklinické modely Huntingtonovy choroby

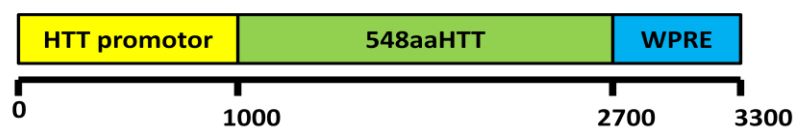
Huntingtonova choroba, která je onemocněním s komplexním psychiatrickými projevy, dlouhou latentní fází a pomalým postupem nemoci, vyžaduje pro preklinickou fázi výzkumu zvířecí model, který bude mít dostatečnou délku života, podobnou architekturu mozku (gyrencefalický mozek) a fyziologii jako člověk. Takovými modely mohou být větší savci vhodní pro chov nebo nám nejpodobnější primáti (Yang et al. 2010, Yang a Chan 2011). Velké zvířecí modely jsou pro svou nákladnost vhodné až v konečné fázi výzkumu nemoci, pro ověření poznatků z hlodavčích modelů a nesavčích modelů. Zásadní jsou zejména pro testování účinnosti a toxicity možných léčiv a pro vyzkoušení operačních a zobrazovacích metod nebo léčebných technik typu buněčné terapie (Aigner et al. 2010, Li a Li 2012, Matsunari a Nagashima 2009).

Výhodou HD pro vytváření modelů nemoci je, že má definovanou genetickou příčinu na rozdíl od jiných neurodegenerativních onemocnění (Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba), kde jsou genetické dispozice kombinované s vlivy prostředí. Díky tomu je možné vytvářet spolehlivé transgenní modely HD, které umožňují sledování patogeneze i symptomů a testování prostředků symptomatické i kauzální léčby nemoci.

Dosud se podařilo vytvořit primáti (*Macaca Mulatta*) (Yang et al. 2008) a ovčí (*Ovis Aries L.*) (Jacobsen et al. 2010) model HD. Nejvhodnějším preklinickým modelem HD se ale zdá být prase (*Sus Scrofa*). Bohužel, u dříve vytvořeného transgenního prasečího modelu HD se vyskytovala vysoká postnatální úmrtnost (Yang et al. 2010). Chov prasete je méně náročný než chov primátů, prase má přiměřenou velikost vrhu a není na rozdíl od primátů eticky problematickým druhem, protože je tradičně chován pro maso (v Evropě je navíc velmi přísná legislativa kontrolující pokusy na primátech). Velikost prasete, jeho fyziologie,

anatomie mozku i délka života z možných modelů nejvíce odpovídají člověku (Aigner et al. 2010, Matsunari a Nagashima 2009). Miniprase je díky své nižší váze člověku velikostí ještě blíže a jeho výhodou je kromě snížených nákladů na chov i možnost použití humánního lékařského vybavení (CT, PET) pro jeho vyšetření. Přestože prase patří mezi sudokopytníky (*Artiodactyla*), kteří jsou člověku evolučně vzdálenější než hlodavci (*Rodentia*), na úrovni proteinové exprese má prase k člověku blíže než myš (Wernersson et al. 2005). Také délka CAG repetice *wtHTT* miniprasete (17-18) (Matsuyama et al. 2000) se pohybuje v rozmezí vyskytujícího se u člověka.

Naše laboratoř použila pro vytvoření transgenního modelu HD Liběchovské miniprase, které je velikostí velmi podobné člověku (Baxa et al. 2013). Modelová transgenní prasata nesou lentivirový konstrukt s exonem 1 *HTT* genu se 124 CAG repeticemi pod kontrolou lidského *HTT* promotoru (obrázek 11). Liběchovský model HD již ukazuje první známky změn fenotypu. U kanců bylo od 13. měsíce pozorováno snížené množství spermií a zhoršení schopnosti penetrace spermií do oocyty. Další známkou začínajících projevů nemoci je snížené množství DARPP32 pozitivních neuronů u TG miniprasat F2 generace (Baxa et al. 2013).



**Obrázek 11:** Sekvence zaklonovaná do lentivirového vektoru použitá pro vytvoření transgenního modelu HD. Exon 1 *HTT* se 124 CAG repeticemi za lidským *HTT* promotorem a *WPRE* sekvence (Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element) zvyšující expresi transgenu (Zufferey et al. 1999). Délky sekvencí jsou orientační. Upraveno podle Baxa et al. (2013).

#### 4.4.2. iPSCs pro modelování neurodegenerativních chorob

Pro modelování neurodegenerativních nemocí, včetně Huntingtonovy choroby, se stal velmi vítaným objev indukovaných pluripotentních kmenových buněk (Takahashi a Yamanaka 2006) a jeho aplikace na lidské buňky (Yu et al. 2007). Pro nemoci jako Alzheimerova choroba a Parkinsonova choroba jsou iPS buňky jako nástroj pro modelování nemoci o to důležitější, že kvůli komplexním a individuálně se lišícím příčinám těchto chorob nelze vytvořit autentický zvířecí model nemoci, který by věrohodně postihoval její patogenezi i příznaky zároveň, a umožnil testovat vhodné léky zpomalující průběh nemoci. iPSCs jsou možností, jak vytvořit *in vitro* model nemoci, který je geneticky shodný s konkrétním pacientem a může sloužit jako neomezený zdroj jeho buněk pro modelování patogeneze

a testování léčiv se zohledněním individuální variability mezi pacienty (Byers et al. 2012, Wojda a Kuznicki 2013). To samozřejmě platí i pro HD, kde je ale variabilita mezi pacienty mnohem menší. Navíc, neurony, které jsou postižené u těchto nemocí, jsou špatně přístupné pro odběr z pacienta a není možné je v kultuře namnožit. iPSCs vytvořené z kožních fibroblastů pacienta mohou naopak být nelimitovaným zdrojem pro diferenciaci nervových prekursorů a různých typů neuronů pro studium mechanismů patogeneze nemoci na buněčné úrovni a testování účinnosti a toxicity léků (Gunaseeli et al. 2010, Onder a Daley 2012).

U HD, kde je příčinou již známá mutace v jednom genu, je možná i oprava defektu na buněčné úrovni homologní rekombinací, diferenciací opravených buněk a jejich transplantace pacientovi. Aplikace buněčné terapie neurodegenerativních onemocnění se zatím z většiny testují na zvířecích modelech (An et al. 2012, Hanna et al. 2007, Wernig et al. 2008b). Zde se tedy tyto dva rozdílné přístupy k modelování Huntingtonovy choroby setkávají. Výhodou terapie autologními buňkami je možnost přijetí transplantátu bez imunitní reakce organismu a nutnosti imunosuprese pacienta (Araki et al. 2013, Guha et al. 2013, Thanasegaran et al. 2013). Imunitní reakce byla dlouhou dobu problémem této metody terapie, i přes genetickou identitu transplantátu (Kaneko a Yamanaka 2013).

Dosud byl vytvořen velký počet linií iPSCs z buněk pacientů s HD a byl potvrzen fenotyp HD na neuronech diferencovaných z těchto iPSCs (Camnasio et al. 2012, HD iPSC Consortium 2012). Fenotyp pozorovaný u HD-iPS buněk zahrnuje zvýšenou lysosomální aktivitu (Camnasio et al. 2012), celkové změny metabolismu, zvýšená citlivost k apoptoze buněk během diferenciací a u diferencovaných striatálních neuronů po odebrání BDNF nebo zvýšená citlivost k vysokým koncentracím glutamátu. Naopak nebyly zaznamenány inkluze proteinů v neuronech (HD iPSC Consortium 2012). Navíc nebyl zaznamenán negativní vliv mHTT na účinnost přeprogramování buněk pacientů (Camnasio et al. 2012), což je případ u jiných nemocí, které mají vliv na poškození DNA a apoptozu (Müller et al. 2012). To potvrzuje vhodnost iPS buněk pro modelování HD.

Limitací iPSCs pro modelování nemocí mohou být genetické mutace vnesené vektory použitými pro přeprogramování a somatické mutace vzniklé během něj (Gore et al. 2011). iPSCs také vykazují rozdíly v epigenetických modifikacích ukazujících na původní buněčný typ (Kim et al. 2010). Neúplné přeprogramování epigenomu může mít vliv na schopnost iPSCs diferencovat do konkrétních buněčných linií. Celkově různé typy mutací vytváří heterogenitu mezi jednotlivými liniemi a mohou mít vliv na fenotypové projevy nemoci *in vitro* u iPSCs nebo z nich diferencovaných buněk. V případě epigenetických modifikací (Polo et al. 2010) a mutací v počtu kopií genů (CNV, copy number variation) se mohou tyto rozdíly v průběhu kultivace iPSCs stírat (Hussein et al. 2011).

### **Cíle diplomové práce**

- 1) Zhodnotit funkčnost a účinnost metod transfekce a transpozice pro přeprogramování pNSCs a PEFs.
- 2) Vytvořit linie piPSCs nesoucí mutovaný huntingtin nevirovou metodou PiggyBac transpozice.
- 3) Otestovat vliv kultivačních podmínek v kombinaci s transkripčními faktory použitými pro přeprogramování na její účinnost a stabilitu morfologie vytvořených piPSCs.
- 4) Potvrdit alespoň některé znaky pluripotence piPSCs a jejich potenciál pro *in vitro* modelování HD.

## **5. Materiál a metody**

### **5.1. Seznam přístrojů**

CCD camera Sensicam (PCO)

Centrifuga Avanti J-26 XPI (Beckman Coulter)

Centrifuga Hettich universal 320R (Hettich zentrifugen)

Centrifuga M-24A (Boeco)

Elektrický zdroj elektroforézy EV231 (Consort)

Elektroporátor CelljectPro (Thermo Scientific)

Gel Logic 200, přístroj pro focení gelů (Kodak)

Inkubátor MO-01 (Major Science)

Incucyte, monitorovací systém pro buněčné kultury (EssenBioscience)

Invertovaný fluorescenční mikroskop IX70 (Olympus)

Laboratorní váhy (Kern)

Laminární box typ EF/S 4 (CleanAir techniek B.V.)

Midi jednotka pro horizontální elektroforézu (Sigma-Aldrich)

Mini centrifuga Z 100 M (Hermle)

MS 1 minishaker (IKA)

NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies)

O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> inkubátor MCO-175M (Sanyo)

Professional Trio Thermocycler (Biometra)

Vakuová pumpa N86-KN18 (KNF Laboport)

Vi-cell XR, přístroj k počítání buněk (Beckman Coulter)

Vodní lázeň SWB-10L-2 (Major Science)

Zahřívací bloček s třepačkou (Eppendorf)

## **5.2. Materiál**

### **5.2.1. Kultivace bakterií**

#### **Tekuté LB médium**

2g Trypton (Fluka), 1 g Kvasinkový extrakt (Fluka), 2 g NaCl (Sigma), destilovaná voda přidaná do objemu 200 ml.

#### **Pevné LB médium**

Do tekutého LB média přidáno 3 g Agar (Sigma)/200 ml.

Oba typy LB média jsou autoklávovány (121°C, 3h). Po zchlazení LB média pod 50°C do něj bylo sterilně přidáno 1 µl/ml Ampicilinu.

#### **Ampicilin**

Zásobní roztok 100 mg/ml v dH<sub>2</sub>O.

### **5.2.2. Kultivace savčích buněk**

#### **Kultivační médium pro prasečí embryonální fibroblasty (PEF médium)**

500 ml DMEM + Glutamax (Life technologies), 10 % FBS (PAA), 1 % NEAA (Life technologies), 0,1 % 50 µM Gentamicin (Life technologies).

#### **PEF transfekční médium (PEFt)**

DMEM+Glutamax, 1 % NEAA

#### **70% FBS médium**

70 % FBS, 30 % základního NSC/PEF média, před použitím vychlazeno v lednici.

#### **20% DMSO médium**

20 % DMSO, 80 % základního NSC/PEF/IPS média, před použitím vychlazeno v lednici.

### **Základní NSC médium**

400 ml DME-F12/HEPES (Sigma-Aldrich), 1,25 % 200 mM Ala-Glu (Sigma-Aldrich), 0,1 mg/ml Heparin (Sigma-Aldrich).

### **NSC-FBS médium**

44 ml základního NSC média, 10 % FBS (PAA), 2 % B27 suplementu bez vitaminu A (Life technologies).

### **NSC-KSR médium**

44 ml základního NSC média, 10 % KSR (Life technologies), 2 % B27 suplementu bez vitaminu A (Life technologies)

### **NSC transfekční médium (NSCt)**

DME-F12/HEPES (Sigma-Aldrich), 2 % B27 suplementu bez vitaminu A (Life technologies), 1,25 % Heparin (Sigma-Aldrich), 1 % Ala-Glu (Life Technologies)

### **Základní IPS médium**

400 ml KO-DMEM (Life technologies), 20 % KSR (Life technologies), 1 % NEAA (Life technologies), 1 % Ala-Glu (Sigma-Aldrich), 0,1 % BME (Life technologies).

### **IPS-LIF médium**

Základní IPS médium, 1 µl/ml LIF (lidský rekombinantní, Life technologies)

### **IPS-INH médium**

IPS-LIF médium, CHIR99021 (CT99021), RepSox (E-616452), Tranylcypromin, 5-Azacytidin a kyselina valproová (1 µl/ml média každé ze sloučenin).

### **IPS-PD médium**

IPS-INH médium, PD0325901 1 µl/ml média.

**Malé molekuly používané pro přeprogramování primárních buněk a kultivaci IPS  
buněk**

Název	Firma	ředěno v	zásobní roztok	ředění v médiu
5-Azacytidine	Sigma-Aldrich	základní IPS médium	500 $\mu$ M	1000x
CHIR99021	Axon Medchem	DMSO	3 mM	1000x
kyselina valproová	Sigma-Aldrich	dH <sub>2</sub> O	5 mM	1000x
PD0325901	Axon Medchem	DMSO	5mM	5000x
RepSox	Sigma-Aldrich	DMSO	5 mM	1000x
Tranylcypromine	Sigma-Aldrich	DMSO	5 mM	1000x

Všechny uvedené zásobní roztoky skladovány v -30°C.

**bFGF (Preprotech)**

Zásobní roztok 10 ng/ $\mu$ l v základním NSC médiu. Alikvoty jsou skladovány v -30°C. Do kultivace NSCs je přidáváno 2  $\mu$ l/ml média bFGF.

**EGF (Sigma-Aldrich)**

Zásobní roztok 20 ng/ $\mu$ l v 10 mM kyselině octové s 0.1% BSA. Roztok kyseliny octové s BSA byl přefiltrován přes 0,22  $\mu$ m filtr (Milipore) před rozpuštěním EGF. Alikvoty jsou skladovány v -80°C. Do kultivace bylo přidáváno 2  $\mu$ l/ml média.

**Gelatin (Želatína)**

1g prášku gelatinu (Sigma) rozpuštěn v 1 l dH<sub>2</sub>O. Roztok je autoklávován (121°C, 3h).

**Heparin (Sigma-Aldrich)**

Práškový heparin byl naředěn v dH<sub>2</sub>O na koncentraci 20 mg/ml a přefiltrován přes 0,22  $\mu$ m filtr (Corning).

**Mitomicin C**

Krystalický mitomicin C (ze *Streptomyces caespitosus*, Sigma-Aldrich) byl naředěn na koncentraci 1 mg/ml v PBS a přefiltrován přes 0,22  $\mu$ m filtr (Corning).



## **PBS**

0,2 g KCl, 0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8 g NaCl, 1,15 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1 l  $\text{dH}_2\text{O}$ . Přefiltrováno přes 0,22  $\mu\text{m}$  filtr (Millipore).

## **Trypsin**

0,5g práškového trypsinu (Sigma), 0,2 g  $\text{Na}_4\text{EDTA}$ , 0,795 g NaCl, 0,04 g KCl, 0,1 g glukóza, 0,035 g  $\text{NaHCO}_3$  v 100 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ . Přefiltrováno přes 0,22  $\mu\text{m}$  filtr (Millipore). Skladováno v  $-30^\circ\text{C}$ .

### **5.2.3. Kalciumfosfátová transfekce**

#### **Chlorid vápenatý (2M $\text{CaCl}_2$ )**

10,8 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  rozpuštěno ve 20 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ , přefiltrováno přes 0,22  $\mu\text{m}$  filtr (Corning). Alikvoty skladovány v  $-20^\circ\text{C}$ .

#### **2x HBS pufr**

1,6 g NaCl, 74 mg KCl, 27 mg  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,2 g glukosy, 1 g HEPES byl rozpuštěn v 90 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ . PH bylo upraveno na 7,05 a objem doplněn do 100 ml. Alikvoty byly přefiltrovány přes 0,22  $\mu\text{m}$  filtr (Corning) a skladovány v  $-20^\circ\text{C}$ .

### **5.2.4. Detekce aktivity alkalické fosfatázy**

#### **Fixační roztok**

10 ml roztoku Citrátu (součást kitu, Sigma-Aldrich), 26 ml Acetonu, 3,2ml 37% formaldehydu.

#### **Barvicí roztok**

0,2 ml nitrátu sodného a 0,2 ml FRV bylo smícháno v 15ml zkumavce. Roztok byl inkubován 2 min při pokojové teplotě a poté naředěn 10 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ . Bylo přidáno 0,2 ml AS-BI a roztok byl chráněn před světlem.

### 5.2.5. Izolace plasmidové DNA

#### **TAE pufr (na agarosovou elektroforézu, ověření integrity pDNA)**

9,68 g TRIS (Serva), 2,28 g kyselina octová, 4 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0), (Sigma-Aldrich) naředěny v 1 l dH<sub>2</sub>O.

#### **TE pufr (pro ředění pDNA)**

1 ml 1M TRIS (pH 7,5) (Serva) a 200 µl 0,5M EDTA (pH 8) (Sigma-Alrich) naředěny v 100 ml dH<sub>2</sub>O.

### 5.2.6. Vektory

#### **pPB-CAG.OSKM-puDtk, 13 295 bp (A)**

Integrativní vektor typu PiggyBac pro expresi v savčích buňkách. Vektor kóduje polypeptid Oct4-Sox2-Klf4-c-Myc propojený samoštěpícími 2A peptidy.

#### **pPB-CAG.OSKML-puDtk, 13994 bp (B)**

Integrativní vektor typu PiggyBac pro expresi v savčích buňkách. Kóduje Oct4-Sox2-Klf4-c-Myc-Lin28 polypeptid propojený samoštěpícími 2A peptidy.

#### **pPB-UbC-EGFP-neo, 7590 bp (C)**

Integrativní vektor PiggyBac typu pro expresi v savčích buňkách. Kóduje EGFP.

#### **pCMV-hyPBase, 6354 bp (D)**

Episomální (neintegrativní) vektor pro expresi v savčích buňkách. Kóduje PiggyBac specifickou transpozázu.

Tyto vektory byly získány od Dr. Kosuke Yusa z Wellcome Trust Sanger Institutu, UK (Yusa et al. 2009).

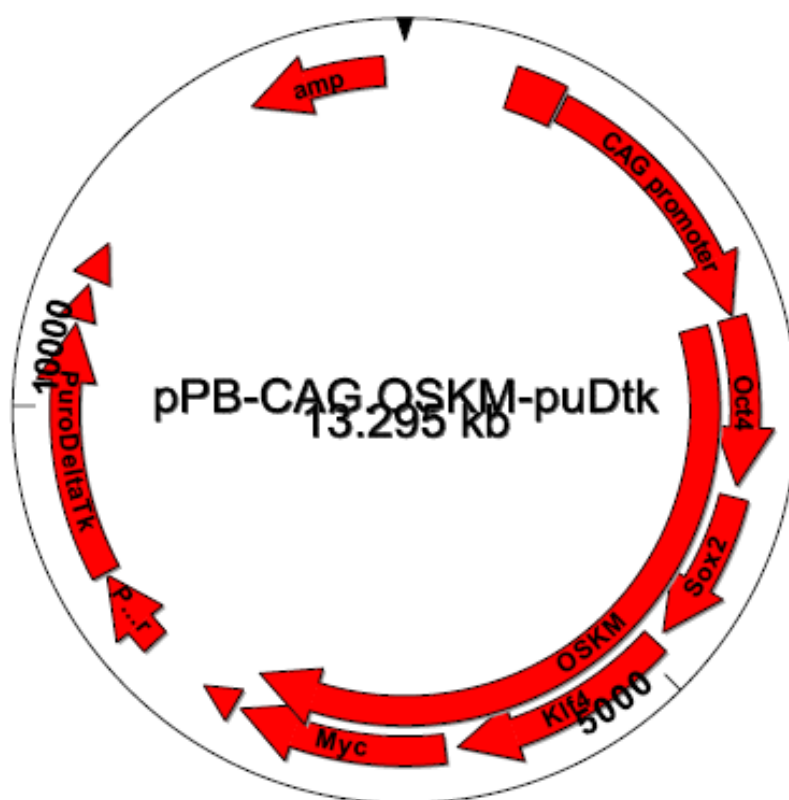
**PiggyBac-Cuo-miR-302/367-IRES-GFP-EF1-CymR-Puro (Biocat GmbH), 10 450 bp (E)**

Integrativní vektor PiggyBac typu pro expresi v savčích buňkách s chemicky indukovatelnou expresí integrative miRNA klastru 302/367.

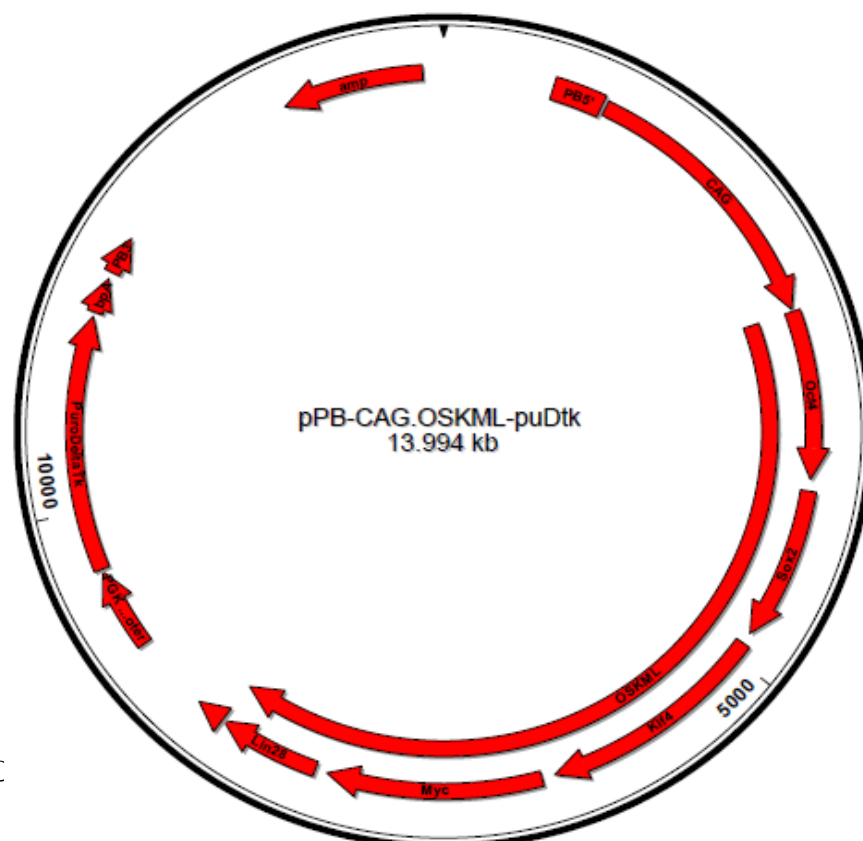
**pMaxGFP, 4700 bp (F)**

Epizomální vektor pro expresi v savčích buňkách. Kóduje EGFP. Vektor byl součástí kitu P3 Primary Cell 4D-Nucleofector® X Kit S (Lonza)

A

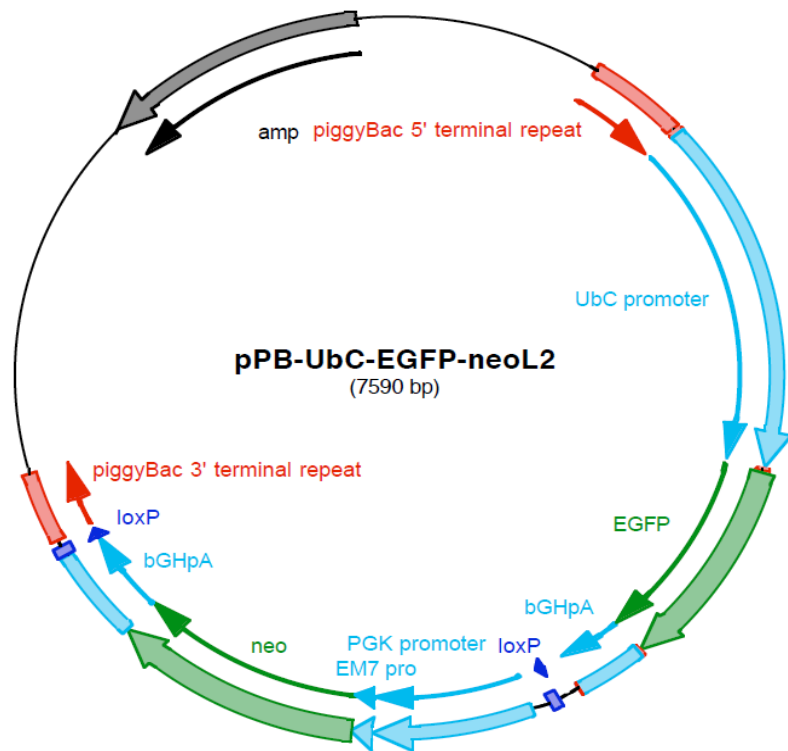


B

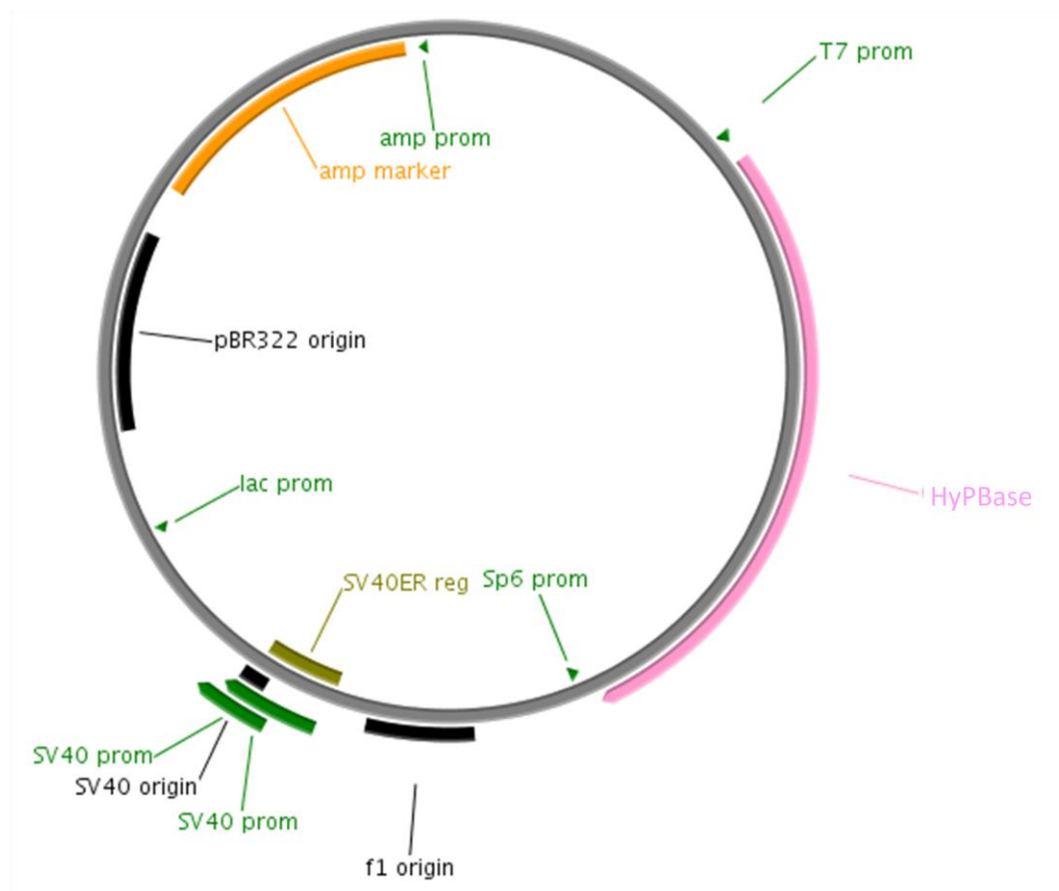


C

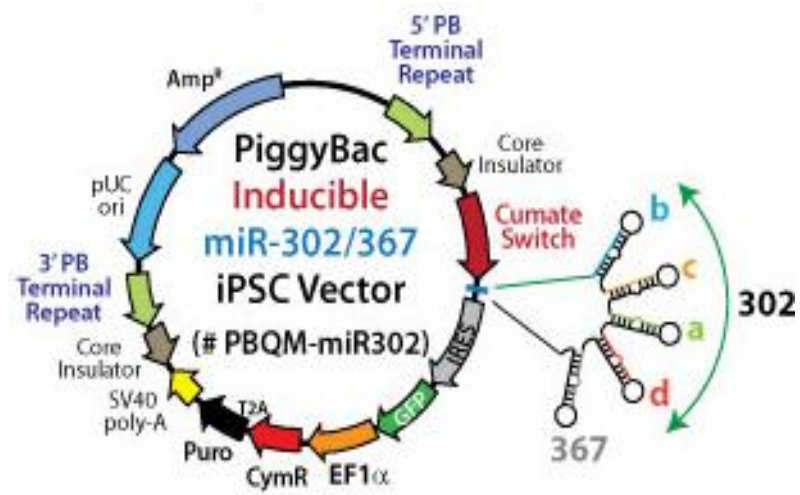
C



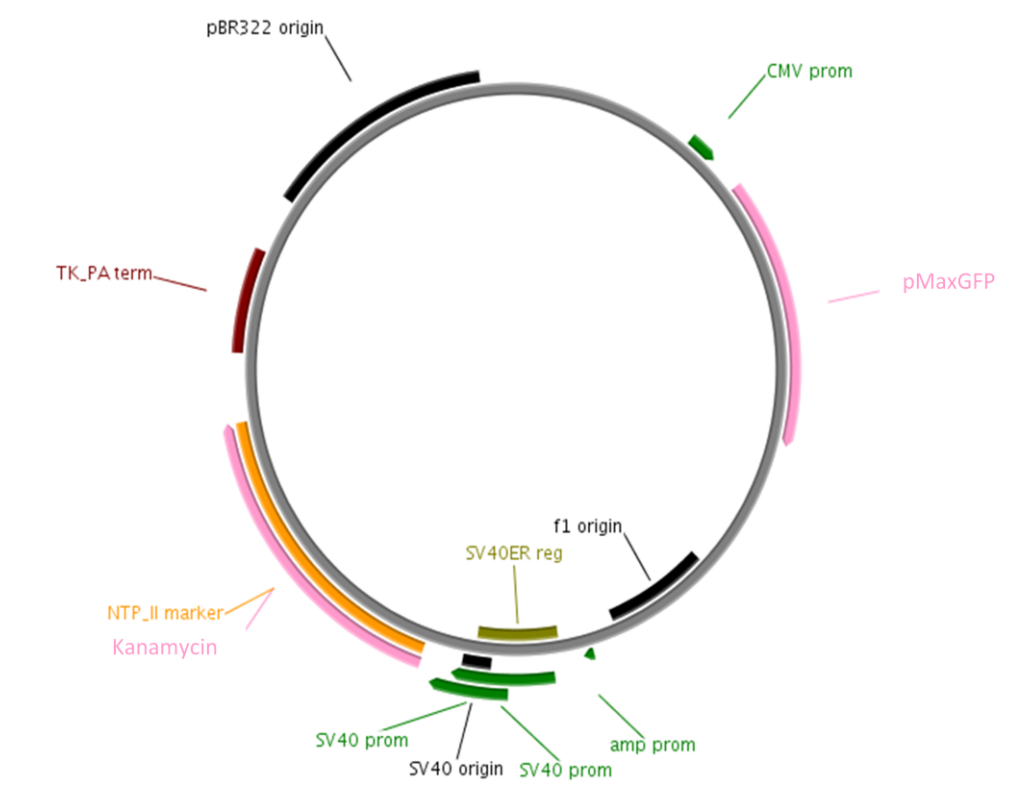
D



E



F



## **5.3. Metody**

### **5.3.1. Izolace primárních buněk**

PEFs a NSCs byly izolovány z 40denních fetů F2 generace Liběchovských miniprasat.

Pro izolaci NSCs byly použity obě hemisféry mozku. Mozková tkáň byla nastříhána na kousky v PBS a několikrát propipetována. Pro oddělení buněčné suspenze od zbytků nehomogenizované tkáně byla použita 70 $\mu$ m sítko (BD falcon). Buněčná suspenze byla centrifugována při 300g 5 min a resuspendována v NSC-FBS médiu zahřátém na 37 °C.

PEFs byly izolovány z těla fetu po odstranění vnitřních orgánů. Tkáň byla nastříhána na malé kousky v PBS. Po sedimentaci tkáně bylo PBS odpipetováno a tkáň byla ponechána 5 min při 37 °C v trypsinu a suspenze byla během působení trypsinu několikrát promíchána. Pro zastavení reakce bylo přidáno studené FBS v poměru 1:1. Sedimentací větších kousků tkáně byla oddělena buněčná suspenze, která byla centrifugována 5 min při 300 g. PEFs byly poté resuspendovány v PEF médiu zahřátém na 37 °C.

Oba typy buněk byly vysety na kultivační misky. Po namnožení byly NSCs i PEFs zamrazeny ve 2. pasáži standardním způsobem v tekutém dusíku.

### **5.3.2. Kultivace buněk**

Primární buňky byly kultivovány při 37 °C v atmosféře s 5 % CO<sub>2</sub> a 95 % atmosférického vzduchu. Primární buňky v procesu preprogramování a IPS buňky byly kultivovány při 37 °C v atmosféře s 5 % CO<sub>2</sub>, 7 % O<sub>2</sub> a 88 % N<sub>2</sub>.

#### **5.3.2.1. Prasečí embryonální nervové kmenové buňky (NSCs)**

NSCs byly kultivovány v kultivačních láhvkách potažených fibronectinem (koncentrace 5  $\mu$ g/ml média). Rozmrazené nebo pasážované buňky byly vysety na láhev v NSC-FBS médiu s EGF a bFGF (oba růstové faktory 2  $\mu$ l/ml média), ve kterém se během 8h přichytily. Po 8h bylo médium vyměněno za NSC-KSR s přidaným EGF, bFGF a LIF (1 $\mu$ l/ml média, Sigma-Aldrich). Následně byla každý druhý den vyměněna polovina média a celá dávka růstových faktorů (EGF, bFGF a LIF).

#### **5.3.2.2. Prasečí embryonální fibroblasty (PEFs)**

PEFs byly kultivovány v PEF médiu. Kultivační láhvy byly potaženy gelatinem (viz 5.2.2.) několik hodin před vysetím buněk. Médium bylo vyměněno každý druhý den.

#### **5.3.2.3. SNL myší fibroblasty (podpůrné buňky)**

SNL je imortalizovaná linie myších STO fibroblastů s geny pro myší LIF a neomycinovou rezistenci. SNL fibroblasty byly kultivovány stejným způsobem jako PEFs (viz 5.3.2.2.). Pro podporu kultivace iPS buněk byly používány inaktivované (nedělící se) SNL fibroblasty (viz 5.3.6.). SNL fibroblasty jsme získali od kolegů z Roslin Institutu ve Skotsku.

#### **5.3.2.4. Prasečí indukované pluripotentní kmenové buňky (piPSCs)**

PiPSCs byly kultivovány na vrstvě podpůrných SNL buněk vysetých den předem. PiPSCs byly kultivovány v IPS médiu s LIF a dalšími malými molekulami (viz. 5.2.2.) Polovina média byla vyměněna každý druhý den, nebo podle potřeby.

#### **5.3.3. Pasážování buněk**

Buňky byly pasážovány při konfluenci okolo 80 %. SNL byly pasážovány stejným způsobem jako PEFs. PEFs byly nejdříve opláchnuty PBS zahřátým na 37 °C. NSCs nebyly před pasáží opláchnuty v PBS. Následující kroky jsou společné pro oba typy buněk. Po odsátí média nebo PBS z lásky byl do ní přidán trypsin (1 ml/75 cm<sup>2</sup>). Po opláchnutí buněk trypsinem byl opět odsán a buňky se zbylým trypsinem byly inkubovány 2-3 min v termostatu. Disociace buněk z povrchu lásky (zakulacení) byla zkontrolována pod světelným mikroskopem. Reakce trypsinu byla zastavena studeným PEF/NSC-FBS médiem. Buněčná suspenze byla přemístěna do plastové 15ml zkumavky a centrifugována při 250 g 3 min. Po centrifugaci bylo médium téměř až na peletu odsáto a buňky byly resuspendovány v 10 ml předeřátého PEF/NSC-FBS média. Počet buněk byl stanoven pomocí přístroje Vi-cell. Požadované množství buněk bylo vyseto na novou, gelatinem (PEFs) nebo fibronectinem (NSCs) potaženou lásku. Gelatin byl z lásky odsát a bylo přidáno čerstvé předeřáté PEF médium. Do něj bylo přidáno určené množství buněčné suspenze PEFs. Suspenze NSCs byla přidána přímo do lásky potažené fibronectinem v NSC-FBS médiu.

IPSCs byly pasážovány mechanicky. Kolonie byly pasážovány pomocí mechanického válečku (Stem cells tool, Life technologies) na 6ti jamkových destičkách nebo pomocí špičky na 12, 24, 48 nebo 96jamkových destičkách. Nejvhodnější moment pro pasáž je před tím, než kolonie začnou splývat, ale pokrývají již 70 – 80 % povrchu jamky. 3 h před pasáží bylo buňkám vyměněno médium. Těsně před pasáží byla buňkám odebrána polovina média. Kolonie byly ve zbytku média nakrájeny válečkem nebo špičkou pipety



na malé kousky. Vzniklé shluky buněk byly z povrchu jamky spláchnuty. IPS buňky byly rozděleny v poměru 1:3 na nové jamky s předkultivovanými podpůrnými buňkami a IPS médiem s LIF, případně dalšími malými molekulami. Celé IPS médium bylo vyměněno druhý den po pasáži.

#### **5.3.4. Zamrazování buněk**

Buňky byly před zamrazením pasážovány standardním způsobem (viz 5.3.4.), resuspendovány v příslušném předeřátém médiu a spočítány. Poté byla buněčná suspenze zcentrifugována při 250 g 3 min. Médium bylo z pelety odsáto a buňky byly resuspendovány ve studeném 70% FBS médiu (viz 5.2.2.) na koncentraci  $3 - 6 \times 10^6/\text{ml}$ . Poté bylo přidáno studené 20% DMSO médium (viz 5.2.2.) v poměru 1:1. 20% DMSO médium bylo přidáváno postupně po kapkách a buněčná suspenze byla stále míchána. 1 ml vzniklé suspenze byl potom přesunut do zamrazovací vialky (Corning) o objemu 1,8 ml. Dobře uzavřené vialky byly přesunuty do izopropanolového bločku a ten umístěn do  $-80^\circ\text{C}$  do dalšího dne. Následující den byly vialky přesunuty do kontejneru s tekutým dusíkem. SNL fibroblasty byly zamrazovány stejným způsobem jako PEFs.

IPS buňky byly zamrazovány po standardní mechanické pasáži v IPS médiu smíchaném s 20% DMSO médiem v poměru 1:1. Buňky z jedné jamky šestijamkové destičky byly obvykle rozděleny do dvou zamrazovacích vialek. Menší jamky byly zamrazovány do 1 vialky. Zpasážované shluky iPS buněk byly přeneseny do 50ml plastové zkumavky. Za stálého míchání bylo do suspenze pomalu nakapáno 20% DMSO médium. Suspenze byla rozdělena do 1,8ml zamrazovacích vialek (Corning) po 1 ml. Vialky byly nejdříve přeneseny v izopropanolovém bločku do  $-80^\circ\text{C}$ , další den byly přemístěny do tekutého dusíku.

#### **5.3.5. Inaktivace SNL fibroblastů**

SNL fibroblasty byly inaktivovány působením gamma záření nebo mitomicinu C. SNL fibroblasty byly nejdříve rozkultivovány na několik  $150\text{ cm}^2$  nebo  $300\text{ cm}^2$  flašek. Buňky byly inaktivovány v 80% konfluenci. Při inaktivaci mitomicinem C byly buňky inkubovány v PEF médiu s 11 -12  $\mu\text{g/ml}$  mitomicinu C (inaktivační médium) 3 h. Poté bylo inaktivační médium odpipetováno a buňky byly 3x opláchnuty v předeřátém PBS. Opláchnuté buňky byly zpasažovány standardním způsobem, spočítány a zamrazeny v alikvotech po  $2 - 4 \times 10^6$ .

Před ozářením byly SNL fibroblasty zpasažovány standardním způsobem a resuspendovány v 50ml plastové zkumavce. Tato buněčná suspenze byla ozářena gamma

zářením, dávkou 96 Gray. Buňky byly spočítány a zamrazeny standardním způsobem v alikvotech po  $3,8 \times 10^6$ .

### **5.3.6. Příprava plasmidové DNA**

#### **5.3.6.1. Elektroporace elektrokompetentních bakterií**

Pro elektroporaci byly použity elektrokompetentní bakterie E. Coli kmen DH5 $\alpha$  (Life technologies). Zotavovací SOC médium (Life technologies) bylo vytemperováno na pokojovou teplotu. Elektroporátor byl nastaven na program A (2500V, 25mF). Alikvot elektrokompetentních bakterií byl rozmrazen a naředěn v poměru 1:1 80% glycerolem. 1  $\mu$ l plasmidové DNA rozpuštěné v TE pufru byl napipetován do bakteriální suspenze. Poté byla tato suspenze přesunuta do předchlazené elektroporační kyvety a ta zasunuta do komory elektroporátoru. Byl spuštěn proces elektroporace. Po proběhnutí elektroporace bylo do kyvety přidáno 250  $\mu$ l vytemperovaného SOC média bez antibiotik a celý objem kyvety byl přesunut do 1,5ml mikrozkušavky. Suspenze bakterií pak byla inkubována v 37 °C při 300 rpm na zahřívacím bločku, po 3 h a 6 h byly odebrány části suspenze a rozetřeny na agarové plotny. Získané kolonie byly dále kultivovány v tekutém LB médiu a zamrazeny s glycerolem nebo použity pro izolaci plasmidové DNA.

#### **5.3.6.2. Kultivace bakterií**

Bakterie (ze zásob zamrazených v glycerolu nebo v měkkém agaru) byly sebrány sterilní kličkou a rozetřeny na povrch předeřáté agarové plotny. Kultivace na agaru probíhala přes noc (12 - 16 h) při 37 °C. Další den jsou vybrány jednotlivé kolonie a kličkou přesunuty do 2 ml předeřátého LB média kde byly kultivovány 8 h v 37 °C při 225 rpm. Vzniklá suspenze bakterií byla přesunuta do 25 ml předeřátého LB média a kultivována přes noc ve stejných podmínkách. Další den ráno byly bakterie sklizeny pro izolaci pDNA. Všechna média obsahují 100  $\mu$ g/ml ampicilinu (Sigma-Aldrich).

#### **5.3.6.3. Příprava glycerolového zásobního roztoku**

0,8 ml bakteriální suspenze z 2ml tekuté prekultivace (viz 5.3.7.2.) bylo smícháno s 0,2 ml 80% glycerolu (Lachema) v 1,8ml vialkách. Bakterie byly v 15% glycerolu uchovávány v -80 °C.

#### 5.3.6.4. Izolace plasmidové DNA

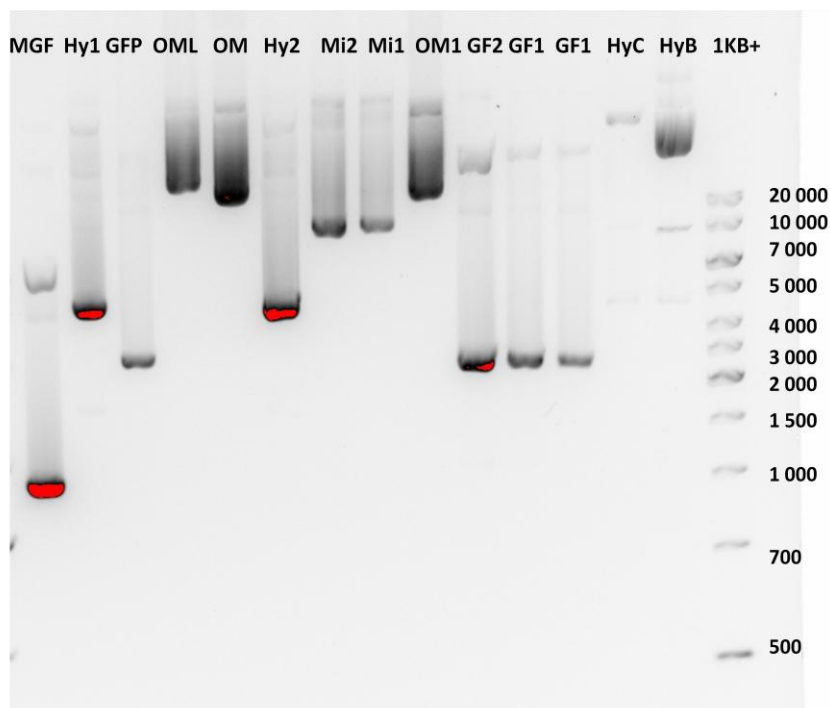
Pro izolaci plasmidové DNA (pDNA) byl použit Plasmid Midi kit (Qiagen). Při izolaci bylo postupováno podle instrukcí výrobce. Bakterie kultivované přes noc (16-18 h) ve 25-30 ml LB média byly centrifugovány při 6000 g 15 min při 4 °C. Bakteriální peleta byla resuspendována v pufru P1 s 1 µl/ml RNAsy A a 1 µl/ml „LyseBlue“ činidla. K suspenzi byly přidány 4 ml lyzačního pufru P2 a po promíchání byla směs inkubována 5 min při pokojové teplotě. Poté byl přidán předchlazený precipitační pufr P3. Dobře promíchaná směs byla inkubována na ledu 15 – 20 min. Vytvořená sraženina byla centrifugována při 21 000 g 30 min při 4 °C. Supernatant obsahující plasmidovou DNA byl znovu centrifugován při 21 000 g a 4 °C 15 min.

Na kolonky pro přečištění pDNA (Qiagen-tip 100) bylo mezitím napipetováno 4 ml pufru QBT. Potom co pufr volně protekl kolonkou, byl na ni napipetován supernatant z poslední centrifugace obsahující pDNA. Po protečení supernatantu byla kolonka dvakrát promyta 10 ml QC pufru. Nakonec byla DNA z kolonky uvolněna 5 ml QF pufru. Takto přečištěná pDNA byla vysrážena 3,5 ml isopropanolu (Serva) a centrifugována při 16 000 g a 4 °C 30 min. Supernatant byl opatrně odlit a k peletě byly přidány 2 ml 70% ethanolu. Opláchnutá peleta byla znovu centrifugována při 16 000 g a 4 °C 10 min. Supernatant opět odlit a peleta vysušena na vzduchu během 10-30 min. Vysušená peleta byla rozpuštěna ve 100 - 200 µl TE pufru.

Koncentrace a kvalita izolované pDNA byla vyhodnocena přístrojem NanoDrop-1000 (naměřené hodnoty by měly být: 260/280 > 1,80, 260/230 > 2,20). Integrita pDNA byla ověřena na agarosové elektroforéze.

#### 5.3.6.5. Agarozová elektroforéza

Byl připraven 1% agarózový gel v TAE pufru s 3 µl na 100 ml GelRed Biotium. Gel zchlazený na 50 °C byl přelit do připravené formy s hřebenem. Po ztuhnutí byl gel přesunut do elektroforetické vany s TAE puftrem. Z gelu byl odebrán hřeben a do jamek byly nanášeny vzorky. Pro ověření kvality DNA bylo použito 100 ng naředěné DNA, smíchané s nanášecí barvičkou 1:6 (6x loading dye, Fermentas). Do jedné z jamek byl nanášen 1 µl žebříku (1 kb # SM0312 nebo 1 kb plus # SM1331 DNA ladder, Fermentas) naředěného ve 4 µl RNase free H<sub>2</sub>O (Nalgene) s 1 µl nanášecí barvičky. Elektroforéza probíhala při napětí 7,2 V/cm a proudu 176 mA 2,5 h. Výsledek (obrázek níže) byl následně vizualizován pomocí zobrazovacího zařízení Kodak Gel Logic 200 při expozici 1-2 s.



**Obrázek:** Výsledek ověření integrity pDNA na agarosové elektroforéze. Některé dříve izolované plasmidy jsou částečně degradované (HyB, OM1, OM, OML).

### 5.3.7. Metody transfekce

#### 5.3.7.1. Lipofekce

Pro lipofekci byl použit Lipofectamine 2000 (Life technologies) nebo Fugene HD (Promega). Pro transfekci jsem použila buňky ve 3. až 5. pasáži. Den před transfekcí byly PEFs vysety v počtu  $1,2 \times 10^5$  na jamku 6jamkové destičky, aby konfluence v den transfekce byla kolem 50 %. NSCs byly vysazeny v počtu  $2 \times 10^5$  na jamku pro dosažení stejné konfluence.

Na každou transfekovanou jamku bylo naředěno 3-5  $\mu\text{g}$  pDNA ve 250  $\mu\text{l}$  PEft/NSCt média (viz 5.2.2.). 9  $\mu\text{l}$  Lipofectaminu bylo naředěno v dalších 250  $\mu\text{l}$  transfekčního média a inkubováno 5 min. Poté byla naředěná pDNA smíchána s naředěným Lipofectaminem a směs inkubována 20 min. Roztok s vytvořenými komplexy DNA-lipid byl přidán k PEFs do standardního kultivačního média. Buňky byly inkubovány s těmito komplexy při standardních podmínkách do druhého dne. Médium bylo vyměněno do 24 h od transfekce.

Pro transfekci Fugene HD bylo naředěno 3 µg pDNA a přidáno 9 µl Fugene HD do transfekčního média do celkového objemu 150 µl. Směs složek byla inkubována 15 min při pokojové teplotě. Vzniklé komplexy v transfekčním médiu byly po kapkách nanесeny na buňky ve standardním kultivačním médiu a inkubovány s buňkami do dalšího dne při standardních podmínkách.

Pokud transfekce probíhala na 12jamkové destičce, bylo množství buněk i reagentů pro transfekci 2,5x nižší.

#### **5.3.7.2. Kalciumfosfátová transfekce**

Buňky byly vysety na 6jamkovou destičku v hustotě  $1-2 \times 10^5$ /jamka jeden den před transfekcí. V den transfekce by buňky měly mít konfluenci kolem 50 %. Pro přípravu transfekční sraženiny bylo naředěno 6 µg pDNA v 140 µl v 0,1x TE pufru. Zvlášť bylo smícháno 140 µl 2xHBS pufru a 20 µl  $\text{CaCl}_2$ . Tato směs byla pomalu nakapána do naředěné pDNA za stálého míchání. Po 1-2 minutách inkubace byla zkontrolována tvorba sraženiny pod mikroskopem. Z buněk bylo odpipetováno médium a bylo uschováno. Na buňky bez média bylo nakapáno 250 µl sraženiny na jamku tak, aby pokrývala co největší povrch. Buňky byly se sraženinou inkubovány 15 min při pokojové teplotě za tmy. Po inkubaci byla buňkám přidána polovina původního a polovina nového kultivačního média a buňky byly takto inkubovány přes noc. Druhý den bylo vyměněno celé médium.

#### **5.3.7.3. Nukleofekce**

Nukleofekce byla prováděna v X-podjednotce 4D Nukleofektoru (Lonza). Pro nukleofekci byl použit P3 Primary Cell 4D-Nucleofector® X Kit S (Lonza) obsahující 16jamkové nukleofekční destičky. Buňky byly zpasážovány v den nukleofekce, spočítány, centrifugovány při 250 g 3 min a resuspendovány ve 20 µl nukleofekčního činidla P3 na reakci. Před použitím byl do nukleofekčního činidla přidán suplement nukleofekčního činidla (součást kitu) v poměru 1:4, 5. Pro každou nukleofekční reakci bylo použito  $5 \times 10^5$  buněk. Resuspendované buňky byly smíchány s 1/1,05/0,8 µg OSKM/OSKML/MiR plasmidu a 0,25 µg Hy plasmidu. Suspenze byla přesunuta do nukleofekční jamky tak aby pokryla dno a destička byla zasunuta do X-podjednotky přístroje. Byl spuštěn přednastavený program. Po skončení nukleofekce bylo do jamek s buňkami přidáno 80 µl předeřhátého PEF/NSC-FBS média s růstovými faktory (EGF, bFGF) a celý objem jamky byl přesunut na kultivační jamky šestijamkové destičky s příslušným médiem. Médium bylo vyměněno

standardně po 8 h v případě NSCs, druhý den v případě PEFs. Pro nukleofekci PEFs byl použit standardní program CZ-167, pro nukleofekci NSCs byl vybrán program CL-133.

#### **5.3.8. Přeprogramování primárních buněk**

Transfekované buňky byly kultivovány na 6jamkové destičce 48 h a poté byly pasážovány na nové 6jamkové destičky s podpůrnými buňkami. NSCs byly vysety v počtu  $0,3-1 \times 10^4$ /jamka. PEF byly vysety v počtu  $0,5-2 \times 10^4$ /jamka. Druhý den po pasáži byla polovina média vyměněna za IPS-LIF médium. 2. a 3. den byla u NSCs vyměněna vždy polovina média za IPS-INH nebo IPS-PD, část buněk byla kultivována v IPS-LIF médium během celého procesu přeprogramování. Od 3. dne byla vyměněna polovina příslušného média každý druhý den, nebo podle potřeby. PEFs byla vyměněna polovina IPS-LIF média každý druhý den během prvních 14 dnů procesu přeprogramování. Poté bylo u některých jamek IPS-LIF vyměněno za IPS-INH nebo IPS-PD a frekvence výměny média zůstala stejná. U buněk byly sledovány morfologické změny a vzniklé iPS-like kolonie byly izolovány na samostatné jamky.

#### **5.3.9. Izolace iPS-like kolonií**

Kolonie buněk připomínající vzhledem pluripotentní ESCs/iPSCs (kolonie s hladkými okraji tvořené drobnými buňkami velmi těsně nahloučenými k sobě) byly označeny ze spodní strany kultivační destičky, sebrány pomocí špičky 10  $\mu$ l mikropipety a přeneseny na vrstvu podpůrných MEFs vysazených den předem na 96jamkovou destičku. Kolonie byly kultivovány v médiu použitém pro přeprogramování, pokud pokryly alespoň 40 % plochy jamky, byly pasážovány na jamku 48jamkové destičky. Nejlépe rostoucí kolonie zachovávající morfologii pluripotentních buněk byly dále expandovány.

#### **5. 3. 10. Detekce aktivity alkalické fosfatázy**

Pro barvení na alkalickou fosfatázu jsme použili komerční kit (Leukocyte alkaline phosphatase staining kit, Sigma-Aldrich). Buňky byly fixovány ve fixačním roztoku (viz 5.2.4.) 1 minutu a opláchnuty dH<sub>2</sub>O 45 s. Na opláchnuté fixované buňky bylo přidáno 0,5 ml barvicího roztoku (viz 5.2.4.) na každou jamku 6jamkové destičky. Buňky byly inkubovány v barvicím roztoku na třepačce (150 rpm/15 min) při pokojové teplotě bez přístupu světla. Poté byly znovu opláchnuty dH<sub>2</sub>O a skladovány v dH<sub>2</sub>O v lednici. Výsledek barvení byl detekován na standardním invertovaném světelném mikroskopu (viz 5.1.).

### **5. 3. 11. Genotypizace**

#### **5. 3. 11. 1. Izolace genomické DNA**

Pro izolaci genomické DNA (gDNA) z buněčné kultury byl použit komerční kit GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Fermentas). Z buněk bylo odsáto médium a byly opláchnuty PBS. Poté byly buňky mechanicky zpasážovány v 1 ml PBS a přesunuty do plastové zkumavky. Zklizené buňky byly zcentrifugovány 5 min při 250 g a po odsátí PBS až na peletu. Na peletu buněk bylo přidáno 200  $\mu$ l lyzačního roztoku s 20  $\mu$ l proteinázy K. Buňky byly homogenizovány pipetováním, přesunuty do 1,5 ml mikrozkuavky a inkubovány na bločku o teplotě 56 °C 10 min při 250 rpm. Po následném přidání 200  $\mu$ l RNasy A byl lyzát zvortexován a inkubován 10 min při pokojové teplotě. Dále bylo přidáno 400  $\mu$ l 50% etanolu a směs promíchána.

Lyzát byl přesunut na kolonku ve sběrné zkumavce a centrifugován 1 min při 6 000 g. Na kolonku v čisté sběrné zkumavce bylo přidáno 500  $\mu$ l promývacího pufru I a kolonka byla centrifugována 1 min při 8 000 g. Proteklý odpad ze sběrné zkumavky byl odstraněn a na kolonku bylo napipetováno 500  $\mu$ l promývacího pufru II. Kolonka byla centrifugována 3 min při 12 000 g. Po odstranění odpadu ze sběrné zkumavky byla centrifugována znovu 1 min při 12 000 g naprázdno. Kolonka byla přesunuta do čisté 1,5ml mikrozkuavky a bylo na ni přidáno 200  $\mu$ l elučního pufru. Po 2 min inkubace při pokojové teplotě byla centrifugována 1 min při 8 000 g. Po centrifugaci byla mikrozkuavka s rozpuštěnou DNA přesunuta na led. Koncentrace DNA a její čistota byly změřeny pomocí přístroje Nanodrop 1000. DNA byla zamrzána v -30 °C.

#### **5.3.11.2. Primery**

Primery použité pro genomickou PCR byly navrženy v programu Beacon Designer (verze 7 a 8). Navržené primery byly připraveny a dodány firmou Life Technologies a dodány v lyofilizovaném stavu. Primery byly rozpuštěny ve vodě bez nukleáz (Nuclease free water, Ambion) na zásobní 100 $\mu$ M koncentraci a na pracovní 10 $\mu$ M koncentraci.

**Primery použité pro genotypizaci:**

název	sekvence	délka	Ta	Délka produktu
Htt RNA F	5' GAAACTTCTGGGCATCGCTATG 3'	22	56 °C	1498 bp
Htt RNA R	5' GAAAGCCATACGGGAAGCAATAG 3'	23		
Klf-myc F	5' CACTACCGCAAACACAC 3'	17	60 °C	501 bp
Klf-myc R	5' AAGTAACTCGGTCATCAT 3'	18		
mOct4 F	5' ATCGGACCAGGCTCAGAGGTA 3'	21	61 °C	70 bp
mOct4 R	5' CCATCCCTCCGCAGAACTC 3'	19		
WPRES F	5' GAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACG 3'	29	56° C	254 bp
WPRES R	5' CAGGCGAGCAGCCAAGGAAAGGACGATG 3'	28		

**5.3.11.3. Polymerázová řetězová reakce (PCR)**

Pro polymerázovou řetězovou reakci byl použit Quick-Load 2x Taq Master Mix (New England Biolabs). Pro každou reakci bylo použito 60 ng gDNA.

**Složení 20µl reakce a teplotní profil reakce:****Htt RNA**

složka	kontrola		program Htt 548		
2x Quick load	10 µl		1.	94°C	2 min
Rnase Free H <sub>2</sub> O	7,8 µl		2.	94°C	30 s
primer F	0,1 µl		3.	56°C	40 s
primer R	0,1 µl		4.	72°C	100 s
gDNA	2 µl		5.	72°C	2 min

Kroky 2. – 4. opakovány 40x, po skončení reakce byly vzorky zchlazeny na 4 °C.

**mOct4**

složka	množství		program mOct4		
2x Quick load	10 µl		1.	94°C	2 min
Rnase Free H <sub>2</sub> O	6 µl		2.	94°C	30 s
primer F	1 µl		3.	61°C	30 s
primer R	1 µl		4.	72°C	15 s
gDNA	2 µl		5.	72°C	2 min

Kroky 2. – 4. opakovány 34x, po skončení reakce byly vzorky zchlazeny na 4 °C.



### Klf-Myc

složka	množství		program Klf-myc		
2x Quick load	10 µl		1.	94°C	2 min
Rnase Free H <sub>2</sub> O	6 µl		2.	94°C	30 s
primer F	1 µl		3.	60°C	30 s
primer R	1 µl		4.	72°C	60 s
gDNA	2 µl		5.	72°C	2 min

Kroky 2. – 4. opakovány 40x, po skončení reakce byly vzorky zchlazeny na 4 °C.

### WPRE

složka	množství		program WPRE		
2x Quick load	10 µl		1.	94°C	2 min
Rnase Free H <sub>2</sub> O	7,8 µl		2.	94°C	30 s
primer F	0,1 µl		3.	56°C	40 s
primer R	0,1 µl		4.	72°C	35 s
gDNA	2 µl		5.	72°C	2 min

Kroky 2. – 4. byly opakovány 34x, po skončení reakce byly vzorky zchlazeny na 4 °C.

Vzorky byly rozděleny pomocí agarosové elektroforézy v 1,5% gelu s GelRed biotium (připraven podle 5.3.6.5.). Do jamek byl nanesen vždy celý 20µl vzorek. Pro vizualizaci délky fragmentů byl použit 50 bp (# SM0373) a 1 kb (# SM0314) DNA žebřík (Fermentas).

## 6. Výsledky

### 6.1. Metody transfekce NSCs

Výběr optimální metody transfekce je zásadní pro úspěšné a robustní přeprogramování buněk nevirovými metodami. Nervové kmenové buňky navíc patří mezi obtížně transfekovatelné buňky, u kterých často nefungují standardní metody transfekce. První transfekční metodou, kterou jsem vyzkoušela, byla kalciumfosfátová transfekce. Tato metoda je náročná na optimalizaci a její použití vyžaduje větší množství použité DNA než jiné metody, je ale levná a v naší laboratoři již byla úspěšně použita pro transfekci NSCs, i když s nízkou účinností. Bohužel, tato metoda transfekce vedla během 24 – 48 h k odlepení NSCs z podkladu a vytvoření neurosfér. Výsledek byl obdobný při transfekci buněk v různém stupni konfluenci (30 – 80 %) i při použití různého pH HBS pufru (7,0 – 7,1), které ovlivňuje míru vytváření sraženiny s chloridem vápenatým. Po opakované reakci NSCs odlepením z podkladu jsem nepokračovala v optimalizaci metody.

Často používanou metodou transfekce je lipofekce. Lipofekce je uživatelsky nenáročnou metodou, existuje řada komerčních lipofekčních činidel, z nichž některá jsou specializovaná na transfekci kmenových nebo obtížně transfekovatelných buněk. Pro transfekci NSCs i PEFs jsme použili nejdříve Lipofectamine 2000 (Invitrogen) a Fugene HD (Promega). Pro ověření účinnosti transfekce byl použit EGFP PB vektor. Metoda lipofekce oběma činidly fungovala uspokojivě u PEFs, kde účinnost transfekce dosahovala 10 – 20 %. U NSCs nebyl pozorován žádný GFP signál po transfekci EGFP PB vektorem pomocí Lipofectaminu 2000 ani Fugene HD s různou koncentrací a poměrem lipofekčního činidla a DNA. Testována byla transfekce NSCs v médiu se sérem (FBS) i bez séra a reverzní transfekce buněk v suspenzi před přisednutím na podklad. Zdálo se tedy, že lipofekce není vhodnou metodou pro transfekci našich NSCs.

Nakonec jsem se rozhodla pro metodu nukleofekce 4D nukleofektorem (Lonza). Výhody nukleofekce pro transfekci buněk za účelem vytvoření iPS buněk jsou popsány v literárním úvodu. Nukleofekce NSCs kontrolním EGFP PB plasmidem ale také nebyla úspěšná a nebyl vidět žádný GFP signál ani po 48 h od nukleofekce. S nukleofekčním kitem jsem obdržela jiný GFP plasmid, který jsem také vyzkoušela. Nukleofekce NSCs tímto pMaxGFP plasmidem vedla konečně k GFP pozitivním NSCs. Opticky více než polovina transfekovaných buněk byla GFP pozitivní po 24 h od nukleofekce. Rozhodla jsem se tedy nukleofekci použít pro transfekci NSCs a později i pro transfekci PEFs, u kterých jsem do té doby používala lipofekci Lipofectaminem 2000.

## 6.2. Ověření funkčnosti EGFP vektoru v pNSCs

Nukleofekce se ukázala být úspěšnou a robustní metodou transfekce NSCs. Výsledek nukleofekce EGFP PB plasmidem mi naznačil, že by mohl být problém s expresí tohoto plasmidu v NSCs. Další možností bylo, že mnou připravená plasmidová DNA nebyla pro nukleofekci dostatečně kvalitně přečištěna a nečistoty v ní bránily nukleofekci. To by mohlo ovlivnit účinnost nukleofekce expresními plasmidy. Při další nukleofekci jsem proto porovnávala účinnost nukleofekce samotným pMaxGFP nebo v kombinaci se stejným objemovým množstvím Hy plasmidu (Hy byl izolován ve stejné váře s EGFP plasmidem a čistota DNA obou plasmidů byla podle Nanodrop srovnatelná a v rámci normálních hodnot čistoty pDNA). Předpokládala jsem, že pokud by izolovaná pDNA nebyla dostatečně kvalitní, snížila by účinnost nukleofekce pMaxGFP plasmidem. Výsledek pokusu ale snížení účinnosti nukleofekce neukázal. Obě skupiny buněk měly 24 h po nukleofekci opticky podobné množství GFP pozitivních buněk. Celkově byla účinnost nukleofekce srovnatelná s předchozím pokusem.

EGFP je v PB plasmidu exprimován z konstitutivního UbC (UbiquitinC) promotoru. Účinnost přepisu z různých promotorů se může u některých typů buněk lišit. Je možné, že tento promotor není vhodný pro expresi v NSCs, přestože v PEFs funguje dobře. U expresních OSKM a OSKML vektorů pohání expresi jiný konstitutivní promotor, CAG, který je kombinací časného enhancer elementu cytomegaloviru (CMV) a kuřecího promotoru beta-actinu. Nefunkčnost kontrolního EGFP plasmidu tedy neznamená nefunkčnost OSKM/L plasmidů pro přeprogramování iPS buněk z NSCs.

## 6.3. Lipofekce NSCs

Dalším krokem bylo ověřit, jestli nepřítomnost GFP signálu po lipofekci EGFP plasmidem je dána skutečně pouze nefunkčností tohoto plasmidu v NSCs nebo je zároveň lipofekce nevhodnou metodou transfekce NSCs. NSCs byly transfekovány EGFP plasmidem nebo pMaxGFP plasmidem. Pro lipofekci byla znovu použita již testovaná činidla Lipofectamine 2000 a Eugene HD podle protokolu popsáního v metodách (5.3.7.1.). Výsledek lipofekce NSCs pMaxGFP plasmidem byl stejný jako u EGFP plasmidu. Žádné GFP pozitivní buňky nebyly vidět po 24 - 48 h u žádné kombinace plasmid/činidlo. Lipofekce tedy pravděpodobně není vhodnou metodou transfekce NSCs.

## 6.4. Účinnost nukleofekce NSCs

4D nukleofektor nabízí řadu profilů nukleofekce, které jsou vhoňé pro konkrétní buněčný typ. Pro nukleofekci s použitím X-podjednotky 4D nukleofektoru, kterou jsem používala, byly vyhodnoceny zatím jen myši NSCs (mNSCs). Standardním programem pro nukleofekci

mNSCs je program CL-133, u něhož je uváděna účinnost nukleofekce 60 % při 80% přežití buněk. Oficiálně byly ale testovány další programy nukleofekce pro mNSCs a jejich účinnost byla publikována. Jako nejlepší z hlediska účinnosti a přežití buněk byly vyhodnoceny programy DS-112 a DS-113 (Bertram et al. 2011). Mým cílem bylo ověřit a porovnat účinnost nukleofekce těmito dvěma programy a výchozím programem CL-133 u prasečích NSCs. Oproti uvedené studii jsem používala odlišnou metodu kultivace NSCs v monolayeru, nikoli klasickou metodu kultivace NSCs v neurosférách. Odlišná metoda kultivace samozřejmě může ovlivnit účinnost nukleofekce.

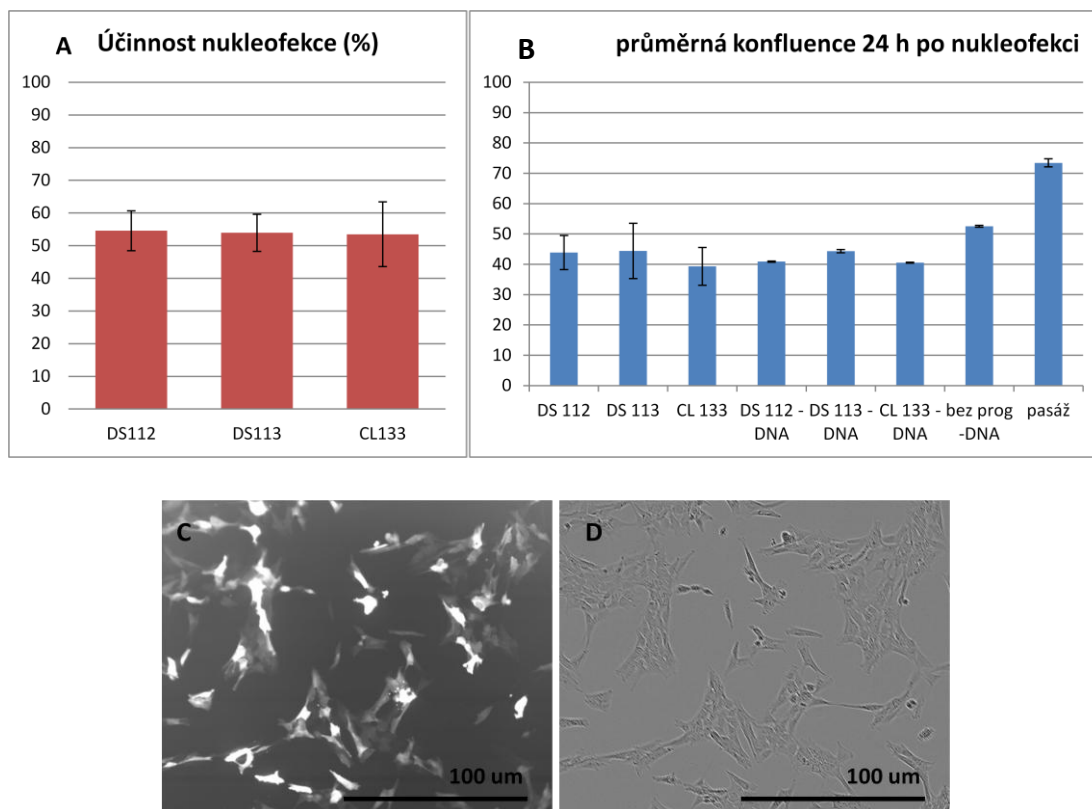
Zhodnocení účinnosti nukleofekce proběhlo na základě dvou nezávislých transfekcí. Při každé z nich byly transfekovány NSCs v duplikaci každým ze tří zvolených programů. Pro každou nukleofekční reakci bylo použito  $5 \times 10^5$  buněk, 0,35  $\mu\text{g}$  pMaxGFP plasmidu a byl použit postup uvedený v sekci metod (5.3.7.3.). Všechny tři programy měly opticky srovnatelnou a vysokou účinnost nukleofekce.

Je důležité zmínit, že účinnost nukleofekce pMaxGFP plasmidem je pravděpodobně nadhodnocena oproti účinnosti vnesení PB plasmidů OSKM/OSKML i proti jiným GFP plasmidům (nepublikované neoficiální informace). PMaxGFP plasmid je relativně malý (4700 bp) a je velmi účinně exprimován (GFP signál byl vidět dříve a byl jasnější než při použití EGFP plasmidu pro nukleofekci PEFs). Dále údaj, který uvádí 60% účinnost nukleofekce a 80% přežití buněk u programu CL-133 (Cell & Transfection database, Lonza, <http://bio.lonza.com/6.html>) se vztahuje k 96jamkovému formátu nukleofekce a zřejmě standardnímu množství pMaxGFP plasmidu (množství použitého plasmidu neuvedeno). Studie Bertram et al. (2011) testující mimo jiné programy DS-112 a DS-113 uvádí přežití buněk kolem 80 % a účinnost nukleofekce 80 - 90 % s použitím 0,5  $\mu\text{g}$  pMaxFGP plasmidu a 2,5 –  $5 \times 10^5$  buněk. Já jsem použila nižší množství tohoto plasmidu s ohledem na možnost porovnání účinnosti nukleofekce s nukleofekcí OSKM a OSKML plasmidu. Větší plasmidy se dostávají do buněk s nižší účinností, na druhou stranu celkové množství pDNA je limitováno toxickou reakcí buněk na příliš vysoké množství cizorodé DNA. 0,35  $\mu\text{g}$  pMaxGFP plasmidu zhruba odpovídá 1  $\mu\text{g}$  OSKM plasmidu a 0,24  $\mu\text{g}$  Hy (molární poměr max 2:1), což je ještě reálné množství DNA pro nukleofekci.

Výsledkem kvantifikace účinnosti nukleofekce programy DS-112, DS-113 a CL-133 (počet GFP pozitivních buněk normalizovaný na konfluenci) nebyl signifikantní rozdíl v účinnosti mezi uvedenými programy. Procento GFP pozitivních buněk se ve všech případech pohybovalo kolem 54 % (DS-112 54,6 %, DS-113 53,9 %, CL-133 53,5 %). Tento výsledek je graficky znázorněn na grafu A v Panelu 1.

Zároveň s účinností nukleofekce jsem kvantitativně zhodnotila vliv jednotlivých programů nukleofekce a DNA na viabilitu buněk a porovnála ji s buňkami, které byly exponovány pouze nukleofekčním činidlu, ale nedostaly elektrický puls a s buňkami, které byly pouze pasážovány. Výsledek je graficky znázorněn v grafu B Panelu 1. Výsledkem tohoto srovnání je, že nukleofekce (vystavení elektrickému pulsu) má obecně negativní vliv na přežití buněk bez ohledu na použitý program. Přítomnost pDNA, alespoň v použitém množství, měřitelný negativní vliv na buňky nemá. Relativně největší rozdíl v konfluenci byl mezi buňkami pouze pasážovanými a buňkami, které byly vystaveny nukleofekčnímu činidlu. Toto skokové snížení počtu buněk po nukleofekci může být částečně vysvětleno ztrátami při samotné manipulaci s buňkami bez ohledu na negativní vliv nukleofekčního činidla. Pro tyto ztráty jsem počítala s 10% navýšením počtu buněk ( $5,5 \times 10^5$  buněk oproti  $5 \times 10^5$  pro buňky pouze pasážované). Toto navýšení ale nemuselo být dostatečné.

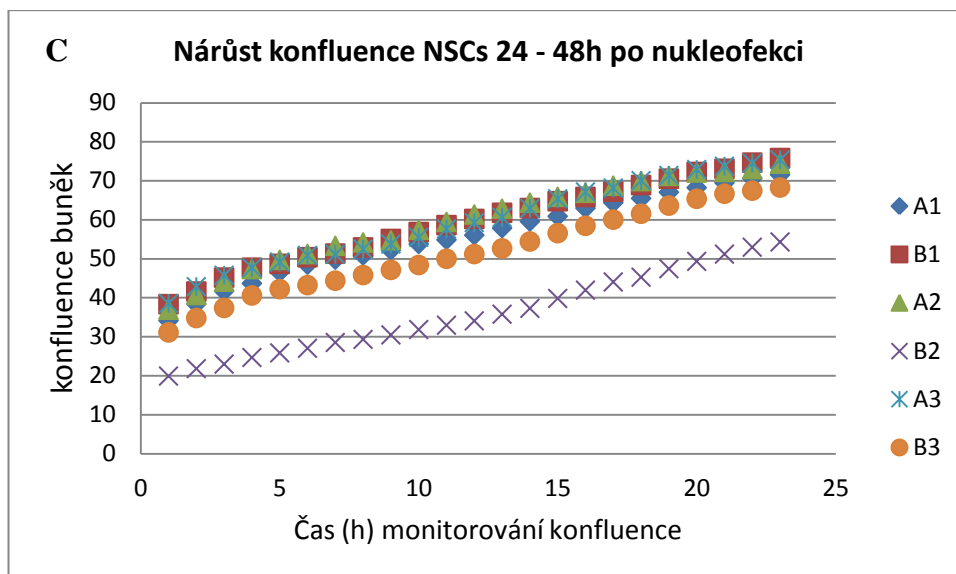
Pokud vezmeme v úvahu průměrnou konfluenci pouze pasážovaných buněk 73,5 % a průměrnou konfluenci buněk transfekovaných 42,5 % (průměr konfluencí u všech použitých programů), je viabilita buněk po nukleofekci necelých 58 %.



### Panel 1: Účinnost nukleofekce a její vliv na mortalitu buněk

Graf A znázorňuje účinnost tří testovaných programů nukleofekce v procentech GFP pozitivních buněk normalizovaných na konfluenci. Graf B zobrazuje vliv nukleofekce, DNA a nukleofekčního činidla na přežití buněk vyjádřené v procentu konfluenc. Chybové úsečky zobrazují v obou grafech hodnotu  $\pm 1$  směrodatné odchylky (SD). Obrázky C a D jsou reprezentativní ukázkou znázorňující množství GFP pozitivních buněk pomocí fluorescence (C) a celkový počet buněk pomocí fázového kontrastu (D).

Nukleofekce jako taková je relativně šetrnou metodou, vzhledem ke své vysoké účinnosti i při použití nízkého množství DNA. Po celou dobu od nukleofekce navíc buňky zvyšovaly svou konfluenci, jak je graficky vyjádřeno na grafu C. Nukleofekce tedy nekompromitovala růstový potenciál primárních buněk, který je důležitý pro jejich úspěšné přeprogramování.



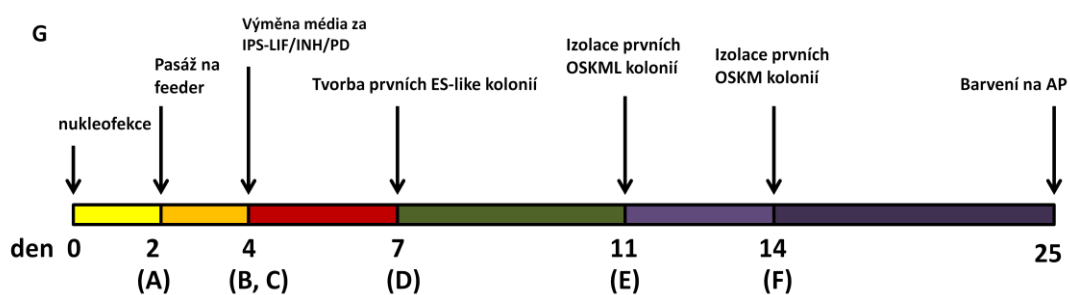
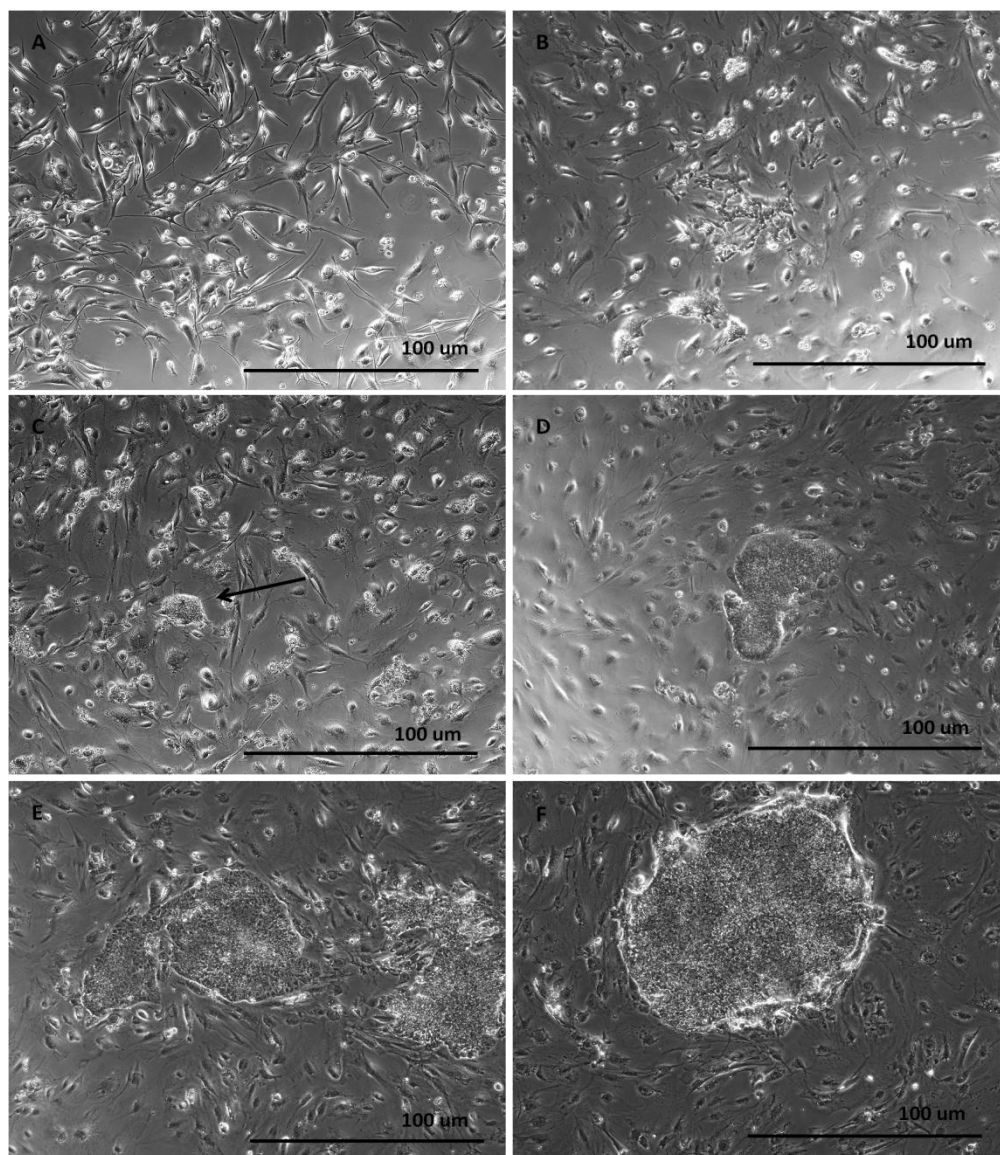
**Graf C: Nárůst konfluency NSCs 24 – 48h po nukleofekci**

V grafu je vynesena nárůst konfluency NSCs během 24 – 48 h od nukleofekce. Bylo sledováno 6 jamek, které byly transfekované v jednom pokusu.

NSCs byly monitorovány v Incucyte 24 – 48 h po nukleofekci a byl sledován nárůst konfluency v čase, který je přímo úměrný rychlosti dělení buněk. Buňky na všech šesti jamkách rovnoměrně zvyšovaly konfluenci během celé doby monitorování. Stejnou rychlostí rostla konfluency buněk s počáteční nižší konfluencí (B2) i ostatních buněk s počáteční vyšší konfluencí.

## 6.5 Příprava prasečích iPS buněk z pNSCs

Ještě před zhodnocením účinnosti nukleofekce jsem pokusně transfekovala  $5 \times 10^5$  NSCs 0,5  $\mu\text{g}$  OSKM nebo OSKML plasmidu a 0,75  $\mu\text{g}$  Hy plasmidu. Pro nukleofekci jsem použila program CL-133. OSKM a OSKML plasmidy nemají GFP reportér, takže jsem nemohla porovnat účinnost nukleofekce s pMaxGFP, ale NSCs po nukleofekci vykazovaly jen mírně zvýšenou mortalitu oproti pasážovaným buňkám a nukleofekce oběma plasmidy vedla k velmi účinnému přeprogramování NSCs. Po 48 h od nukleofekce jsem NSCs zpasážovala na podpůrné buňky. Použila jsem množství  $1\text{--}6 \times 10^4$  buněk na jamku 6jamkové destičky. Transfekované NSCs byly od 4. dne po transfekci (D4) kultivovány v médiu IPS-LIF nebo IPS-INH. Již v D5 byly vidět shlukující se buňky a první změny jejich morfologie. V D7 se již dalo mluvit o prvních koloniích, i když ne úplně kompaktních. Po dalších dvou dnech kultivace byly šestijamkové destičky pokryté koloniemi a tvořily téměř souvislou vrstvu podobně jako v práci (Silva et al. 2008b). Některé kolonie jsem izolovala na samostatnou 96jamkovou destičku (1. pasáž), ale izolované kolonie se nepodařilo ve 2. pasáži namnožit.



**Panel 2:** Proces přeprogramování pNSCs do stavu pluripotence. Na obrázcích A – F jsou vidět postupné změny morfologie buněk během procesu přeprogramování. Písmena odpovídají časovým bodům vyznačeným na schématickém diagramu (G).



Ve druhém pokusu o vytvoření iPS buněk z NSCs jsem snížila množství NSCs použitých pro přeprogramování. Na podpůrné buňky jsem pasážovala  $0,3\text{--}1 \times 10^4$  buněk na jamku 6jamkové destičky. Množství použité pDNA pro nukleofekci jsem zvýšila tak, aby množství OSKM a OSKML plasmidu odpovídalo molárnímu množství pMaxGFP použitého pro ověření účinnosti nukleofekce. Použila jsem  $1\text{ }\mu\text{g}$  OSKM/ $1,05\text{ }\mu\text{g}$  OSKML a  $0,24\text{ }\mu\text{g}$  Hy na  $5 \times 10^5$  buněk a opět program CL-133.

Po této nukleofekci jsem pozorovala zvýšenou úmrtnost buněk oproti kontrole bez DNA i oproti předchozímu pokusu. Přesto byla i druhá nukleofekce úspěšná. NSCs byly od D4 kultivovány v IPS-LIF, IPS-INH nebo IPS-PD médiu, které bylo vyzkoušeno nově. Po několika dnech byly vidět morfologické změny a velmi brzy i kolonie s pluripotentní morfologií. Změny morfologie během přeprogramování a jeho časový průběh jsou zobrazeny v panelu 2.

Výsledkem tohoto pokusu bylo několik desítek izolovaných kolonií s pluripotentní ES-like morfologií. Kolonie iPS-like buněk byly izolovány ze všech kultivačních podmínek. Počty izolovaných kolonií jsou uvedeny v tabulce 1.

	LIF	INH	PD
OSKM	12	18	3
OSKML	13	32	8

**Tabulka 1:** Počty izolovaných kolonií vzniklých přeprogramováním NSCs transfekovaných plasmidy OSKM a OSKML a kultivovaných v různých podmínkách (médiu IPS-LIF, IPS-INH, IPS-PD).

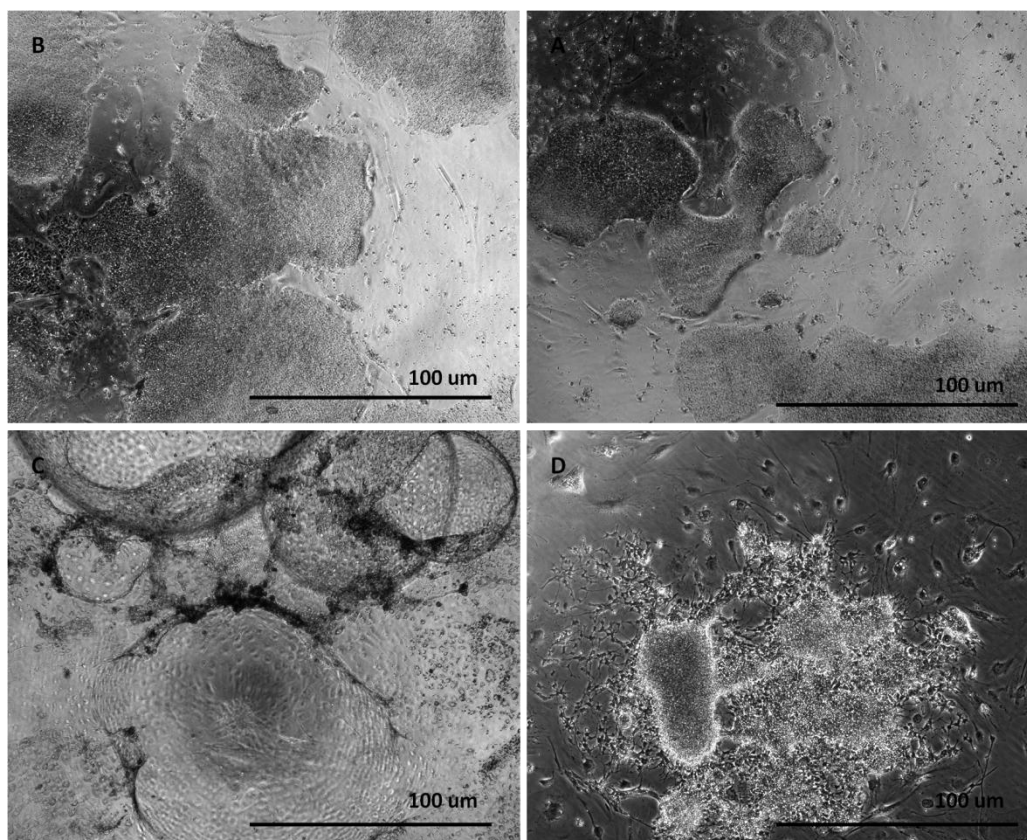
### 6.5.1. Zhodnocení vlivu Lin28 a kultivačních podmínek na proces přeprogramování

U NSCs transfekovaných OSKML plasmidem (NSC-OSKML) byl proces přeprogramování ve shodě s teoretickými předpoklady rychlejší. Lin-28 (L) zvyšuje proliferativní schopnost buněk a blokuje tvorbu Let-7 miRNA, jejíž hladina se zvyšuje u diferencujících buněk (Hafner et al. 2013, Yu et al. 2007). OSKML plasmid vedl ke změnám morfologie a výskytu ES-like kolonií o 2 -3 dny dříve než OSKM plasmid. Celkový počet kolonií izolovaných z NSC-OSKML byl o 60 % vyšší než u NSCs transfekovaných OSKM (NSC-OSKM) (celkem 53 kolonií oproti 33 koloniím). Tento údaj může být trochu zkreslující, protože kolonií, které bylo možné izolovat, bylo celkově mnohem více u obou skupin buněk. Z izolovaných kolonií jich celkem 31 (11 OSKM a 20 OSKML) bylo schopno udržet stabilní morfologii bez tendence k diferenciaci během

expanze na 48jamkové destičce (2. – 3. pasáž). Tyto kolonie byly ve 2. nebo 3. pasáži zamrazeny.

Přestože kolonie s morfologií pluripotentních buněk byly izolovány ze všech kultivačních podmínek, pouze kolonie kultivované v IPS-INH médiu si stabilní morfologii dokázaly udržet i během prvních pasáží (Panel 3 A, B). Kolonie izolované i neizolované (kultivované dál na 6jamkové destičce) v IPS-LIF podmínkách začaly během jednoho týdne od výskytu prvních kolonií masivně diferencovat do TE (Panel 2 C). Ojedinělá diferenciaci do TE se objevila i u kolonií kultivovaných v IPS-INH podmínkách, většina kolonií si ale stabilní morfologii bez tendence k diferenciaci udržela.

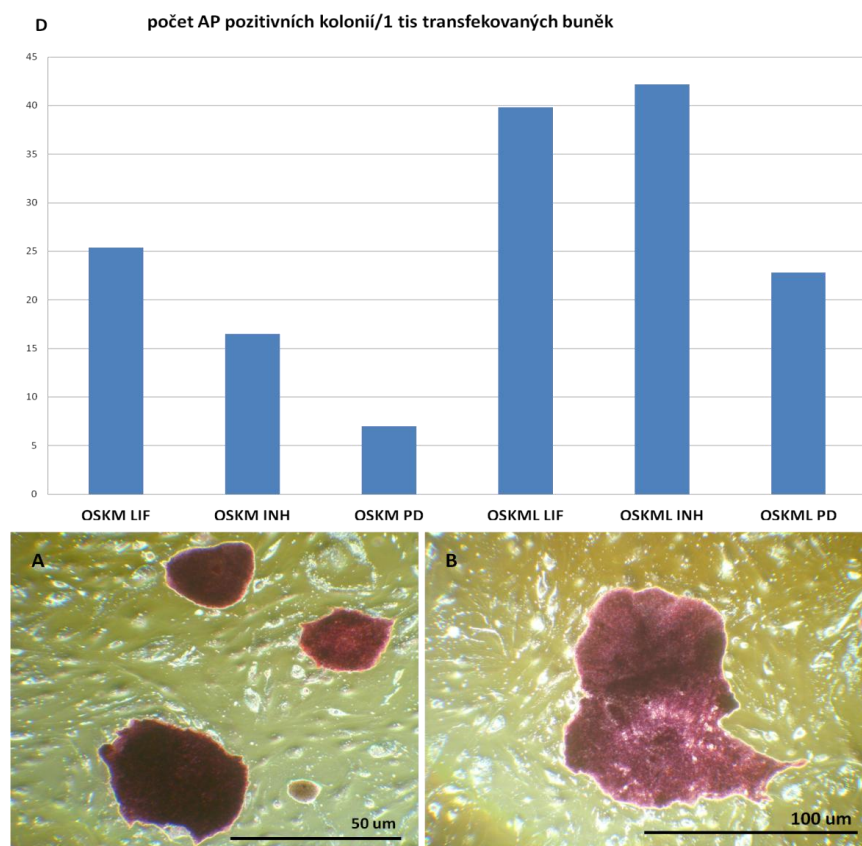
IPS-PD podmínky kultivace vedly k diferenciaci většiny kolonií do nervových prekurzorů a neuronů (Panel 2 D), po přidání IPS-PD média zdiferencovaly během tří dnů. To bylo pravděpodobně způsobeno příliš časným přidáním PD inhibitoru do kultivace. NSCs jsou závislé na bFGF, které u nich vede mimo jiné k aktivaci MEK/ERK signalizace. Pokud je tato signalizace inhibována u buněk, které ještě nedosáhly pre-iPS stavu, může zvrátit dediferenciaci zpět a vést k diferenciaci buněk do neuroektodermální linie. Ve shodě s tím se u NSC-OSKML objevil větší počet kolonií s pluripotentní morfologií i v PD podmínkách, přeprogramování u nich probíhalo rychleji. D14 jsem vyměnila IPS-PD médium za IPS-INH. Část kolonií si díky tomu zachovala pluripotentní morfologii.



**Panel 3:** Morfologie buněk v různých kultivačních podmínkách. IPS-INH D32 2. pasáž (A, B), IPS-LIF D25 1. pasáž (C), IPS-PD D15 (D).

### 6.5.2. Aktivita alkalické fosfatázy piPSCs

Všechny kolonie byly izolovány mezi D11 a D22 u iPS-OSKML a mezi D14 a D22 u iPS-OSKM. D25 byly neizolované kolonie na 6jamkových destičkách nabarveny pro zjištění aktivity alkalické fosfatázy (AP). AP je markerem ESCs, EpiSCs a iPSCs (Thomson et al. 1998). Výsledkem barvení byly desítky kolonií pozitivních na AP. Některé větší kolonie měly mozaikovitou strukturu barvení, středové nebo i okrajové oblasti větších kolonií diferencují, pokud nemají dost místa pro expanzi. I přes relativně nízký počet výchozích buněk použitých pro přeprogramování byly v D25 jamky poseté koloniemi nebo jejich diferencovanými deriváty. Hodně kolonií srostlo dohromady a nemohly být rozlišeny. Zároveň byly vidět zřejmě právě vznikající malé intenzivně barvící kolonie. Výsledky jsou vyneseny v grafu D a ukázkové AP pozitivní kolonie jsou na obrázcích A, B panelu 4.



#### Panel 4: Počet kolonií s aktivitou alkalické fosfatázy

V grafu D je vyneseny počty AP pozitivních kolonií vzniklých v různých kultivačních podmínkách. Vzorové kolonie jsou ukázány na obrázcích A, B. Počet AP pozitivních kolonií byl přepočítaný na tisíc transfekovaných buněk použitých pro přeprogramování. Kolonie byly barveny D25 od nukleofekce. Počet AP pozitivních kolonií jasně převažuje u OSKML transfekovaných buněk. Do počtu AP pozitivních kolonií jsem započítala i izolované kolonie, které jsem dále expandovala, ale zatím u nich nebylo provedeno barvení na AP.

#### 6.5.3. Účinnost přeprogramování NSCs

Účinnost přeprogramování byla zhodnocena právě na základě počtu AP pozitivních a izolovaných kolonií. Účinnost přeprogramování pro různé kombinace vektoru a kultivačních podmínek je uvedena v tabulce 2. Z tabulky je zřejmé, že účinnost přeprogramování byla u iPS-OSKML srovnatelná v IPS-LIF a IPS-INH podmínkách a u iPS-OSKM dokonce vyšší v IPS-LIF podmínkách. Může to být dáno tím, že inhibitory byly (opět zejména u NSC-OSKM) přidány do média v příliš časně fázi přeprogramování a mohly kompromitovat dělení nebo signalizaci u buněk, které ještě nedosáhly dostatečně dediferencovaného stavu. Inhibiční podmínky byly aplikovány na NSC-OSKM

i NSC-OSKML v D4 podle práce Silva et al. (2008b). NSC-OSKML vytvořily ve všech podmínkách vyšší počty kolonií. Tento výsledek je ve shodě s jejich rychlejším předpokládaným přeprogramováním NSC-OSKML v porovnání s NSC-OSKM.

	LIF	INH	PD
OSKM	2,53 %	1,65 %	0,7%
OSKML	3,98 %	4,54 %	2,28 %
zvýšení účinnosti o	57%	175%	223%

**Tabulka 2:** Účinnost přeprogramování s použitím TFs OSKM nebo OSKML v různých podmínkách kultivace spočítaná na základě počtu AP pozitivních kolonií a izolovaných kolonií. V dolním řádku tabulky je uvedeno procentuální zvýšení účinnosti přeprogramování pomocí OSKML v porovnání s OSKM kazetou.

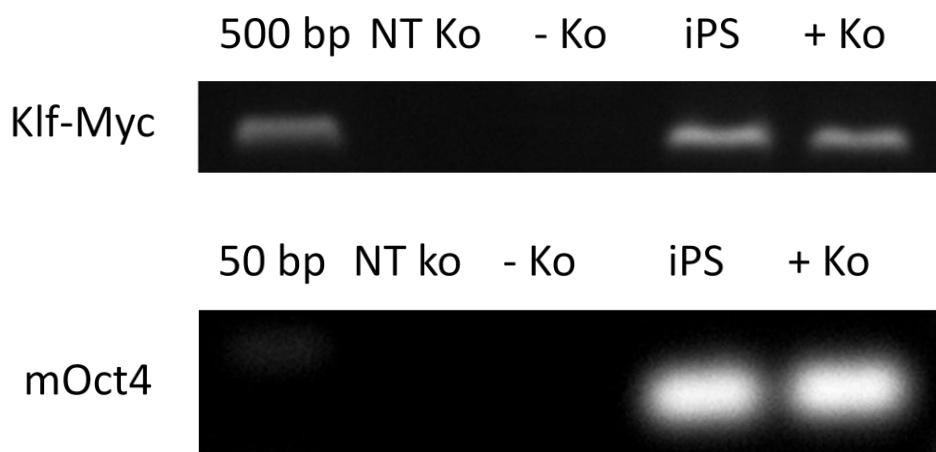
#### 6.5.4. Genotypizace iPS buněk vytvořených z NSCs

Všechny primární buňky použité pro přeprogramování byly izolovány z jednoho transgenního fétu nesoucího transgen s N-terminálním fragmentem *HTT* s polyCAG repeticí (HTT transgen). Tato linie byla označena jako linie # 2 HD. Integrace HD transgenu byla tedy stanovena už u výchozích linií PEFs a NSCs (panel 5). Bylo ale třeba ověřit, jestli je transgen v iPS buňkách stále přítomen nebo jestli nedošlo k chybě v označení buněk. Pro ověření integrace N-terminální části *HTT* byly použity primery používané pro standardní genotypizaci prasat v našem chovu. DNA nebyla izolována přímo z některé primární linie iPS buněk, ale byly použity buňky kultivované v iPS-LIF médiu, které kolonie vytvořily, ale později zdiferencovaly. Jako pozitivní a negativní kontrola byla použita gDNA z biopsií fibroblastů prasat, u kterých již byla ověřena přítomnost nebo nepřítomnost transgenu. Výsledek ověření přítomnosti transgenu (panel 5) byl pozitivní, band byl ale velmi slabý při několika opakováních genotypizace.

Zároveň bylo potřeba ověřit integraci PiggyBac kazety do genomu přeprogramovaných buněk. Použitý PiggyBac vektor obsahuje myší sekvence genů. Proto pro ověření byly navrženy primery v oblasti *mOct4*, která se liší od prasečího genu. Dále byly navrženy primery amplifikující úsek zasahující do *Klf4* – 2A – *c-Myc*. Tento úsek se také vyskytuje specificky pouze ve vneseném transgenu. Zde byla jako pozitivní kontrola použita pDNA OSKML používaná pro transfekce a jako negativní kontrola opět gDNA z fibroblastů ověřeného netransgenního prasete. Výsledek ověření integrace OSKML kazety byl potvrzen oběma páry primerů (panel 6).



**Panel 5:** Ovření integrace HTT transgenu u linií PEFs, NSCs a přeprogramovaných buněk # 2. Primery HTT RNA i WPRE jsou standardně používány pro genotypizaci Liběchovských miniprasat.



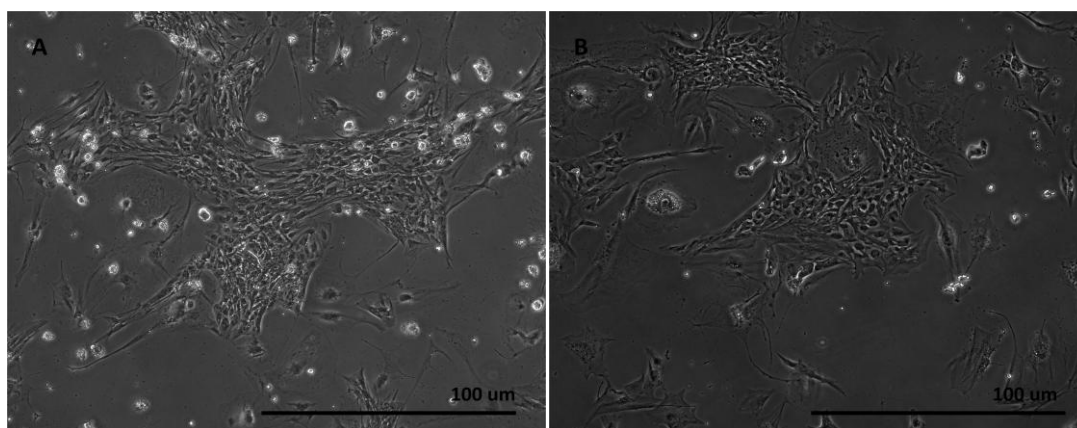
**Panel 5:** Pozitivní výsledek detekce mKlf4 – 2A – c-Myc a mOct4 na OSKML vektoru integrovaném v iPSCs pomocí genomické PCR. NT Ko (kontrola bez templátu, no template control)

### 6.5.5. Otestování inducibilního MiRNA vektoru pro přeprogramování pNSCs

Pro přeprogramování NSCs jsem použila ještě MiRNA PB vektor s indukovatelnou expresí genu pro miRNA klastr 302/367. Tento plasmid exprimuje navíc GFP z IRES (vnitřní místo pro vstup ribozomu, internal ribosomal entry site) sekvence připojené za genem pro miRNA. Mým dalším cílem bylo zaklonovat do této kostry vektoru na místo miRNA genu geny *Oct4* a *Klf4* nebo jen *Oct4*, a pokusit se tak vytvořit piPS buňky s nižším počtem transkripčních faktorů. Bohužel, kvůli již popsaným problémům s transfekcí jsem si nemohla být jistá, jestli byl plasmid skutečně do NSCs vnesen a jestli je funkční. GFP signál nebyl pozorován ani po transfekci PEFs tímto vektorem a indukci Cumate (System Biosciences).

Po použití nukleofekce pro vnesení tohoto plasmidu do NSCs ale také nebyl viditelný žádný GFP signál, ani po indukci exprese nejvyšší doporučenou dávkou Cumate. Důvodem nepřítomnosti GFP signálu mohla být snížená exprese GFP z IRES sekvence. Nukleofekce byla provedena za stejných podmínek jako u dalších pokusů s NSCs. Množství použité plasmidové DNA také odpovídalo, takže lze předpokládat, že plasmid byl úspěšně vnesen a integrován do genomu buněk.

NSCs transfekované MiRNA vektorem a kultivované v IPS-LIF, IPS-INH nebo IPS-PD podmínkách více než měsíc výrazněji nezměnily morfologii směrem k fenotypu iPS buněk a po celou dobu nebyl u transfekovaných buněk pozorován GFP signál. Morfologie NSCs transfekovaných miRNA vektorem je ukázána na obrázcích A, B panelu 4.



**Panel 6:** NSCs transfekované MiRNA plasmidy a kultivované v iPS-LIF médiu. D25. Mezi NSCs neindukovanými Cumate (A) a indukovanými 10x koncentrací Cumate (300 µg/ml) (B) není viditelný výrazný rozdíl. Tyto buňky byly kultivovány více než týden také v IPS-INH médiu, které vedlo k jejich velmi nízké proliferaci a bylo vyměněno za IPS-LIF médium v D10.

## 6.6. Příprava prasečích iPS buněk z PEFs

Pro přípravu iPSCs z PEFs jsem stejně jako u NSCs použila OSKM a OSKML vektory v kombinaci s Hy. Lipofekce Lipofectaminem 2000, kterou jsem použila jako první pro vnesení plasmidů do PEFs fungovala relativně dobře, účinnost byla 10–20 %. PEFs transfekované Lipofectaminem byly dále kultivovány stejným způsobem jako NSCs, 48 h po transfekci byly přeneseny na vrstvu podpůrných buněk a kultivovány v IPS-LIF nebo IPS-INH podmínkách. PEFs byly pasážovány na 10cm misky, nikoli na 6jamkové destičky, kvůli relativně nižší účinnosti transfekce a nižšímu potenciálu PEFs k přeprogramování bylo potřeba větší množství výchozích buněk. Pro první pokusy jsem použila  $1\text{--}3 \times 10^5$  buněk na 10cm misku. Jako nejlepší se ukázalo použití  $1 \times 10^5$  buněk, které mohly na misce relativně dlouho proliferovat bez pasáže a stále bylo množství buněk teoreticky dostatečné pro přeprogramování. Přesto i v tomto rozložení pokusu buňky během 14 dnů přerostly a bylo potřeba je pasážovat. Obecně byla účinnost přeprogramování velmi nízká a v přerůstajících PEFs se tvořily jen drobné kolonie, které nebylo snadné izolovat a nikdy se je nepodařilo expandovat ani na 96jamkové destičce.

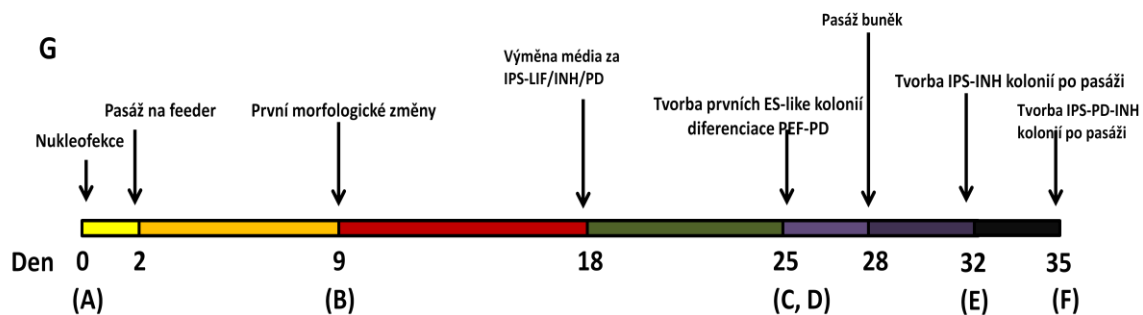
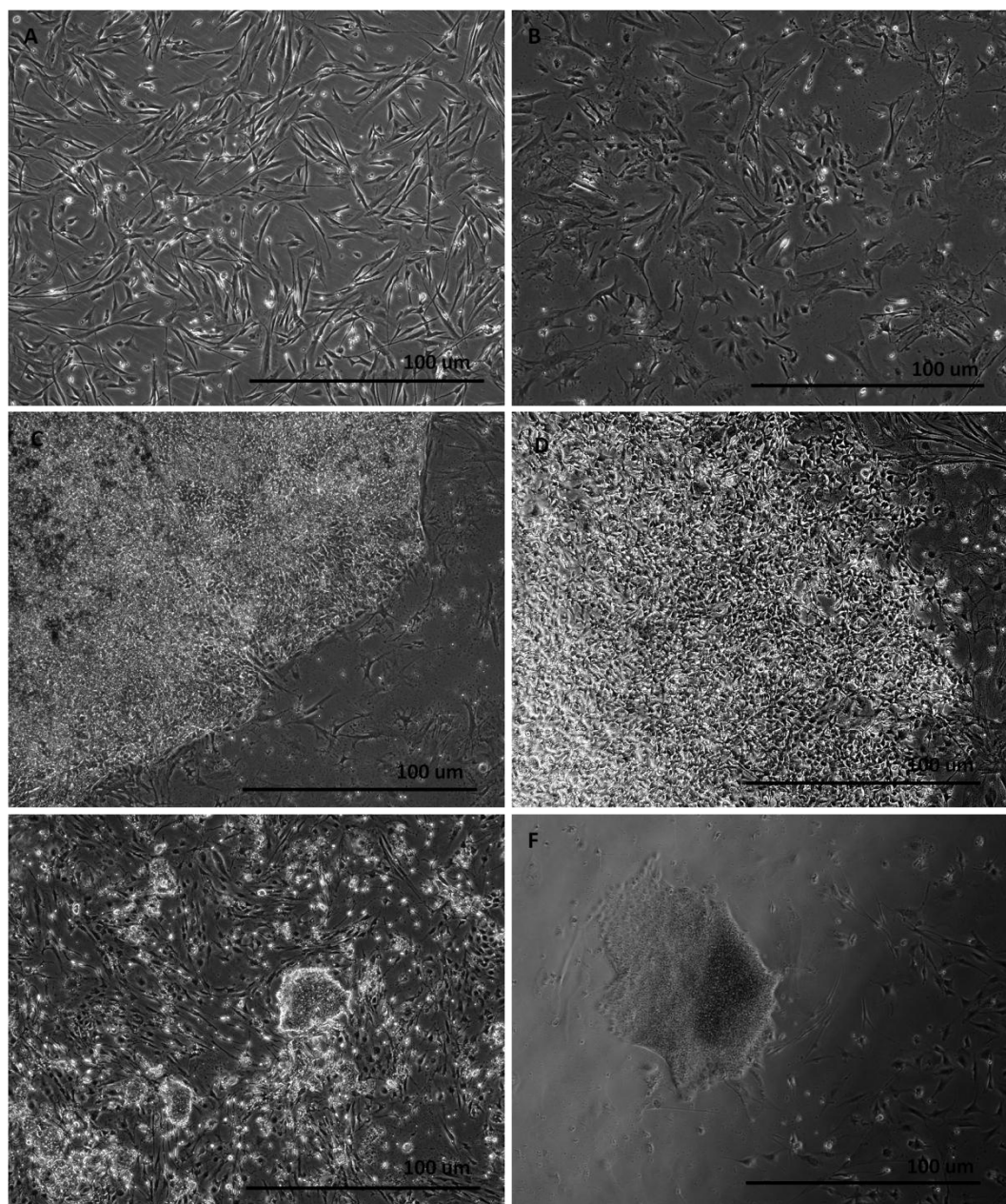
Jediná kolonie, která byla dostatečně velká s pravidelnou morfologií pluripotentních buněk, vznikla při pokusu o přeprogramování, kdy jsem nechala transfekované PEFs kultivovat bez pasáže na 6jamkové destičce. Objevila se velmi brzy, asi týden po transfekci. Tato situace ale byla ojedinělá. Lipofekce pravděpodobně není dostatečně robustní metodou pro vnesení plasmidů do PEFs za účelem jejich přeprogramování.

Proto po úspěšném použití nukleofekce pro transfekci NSCs jsem se rozhodla tuto metodu vyzkoušet i u PEFs. Pro nukleofekci byl použit stejný typ nukleofekčního činidla a standardní proram CZ-167, používaný u myších embryonálních fibroblastů. PEFs byly transfekovány pMaxGFP a EGFP plasmidem pro zhodnocení účinnosti nukleofekce, byla ale transfekována jen jedna jamka každým plasmidem. Účinnost této nukleofekce byla 56,4 % pro EGFP a 79,4 % pro pMaxGFP, tedy dostatečně vysoká. Reálnější je pravděpodobně hodnota účinnosti spočítaná pro EFGP. Pro nukleofekci bylo použito 0,35  $\mu\text{g}$  pMaxGFP a odpovídajících 0,57  $\mu\text{g}$  EGFP.

Nukleofekce PEFs OSKM a OSKML plasmidy probíhala stejným způsobem jako u NSCs. Na vrstvu podpůrných buněk bylo vyseto 48 h po nukleofekci  $0,5\text{--}2 \times 10^4$  buněk na jamku 6jamkové destičky. IPS-INH a IPS-PD médium bylo přidáno až v D18 kdy byly pozorovány shluky epiteliálních buněk (obrázek B panelu 7). Do té doby byly PEF-OSKM/L kultivovány v IPS-LIF médiu. Přesto PEFs v PD médiu také diferencovaly do buněk s morfologií neuronů (obrázek D panelu 7).



První kolonie s hladkými okraji a kompaktními buňkami byla pozorována v D21 u buněk v IPS-LIF médiu transfekovaných OSKML (obrázek C). Buňky ještě nebyly dostatečně kompaktní. Naopak tato obrovská kolonie měla od začátku tendenci diferencovat v centrální části. Dalších den jsem vyměnila médium za IPS-INH. Morfologie se příliš neměnila, ale okolní buňky byly hodně přerostlé. Proto jsem tyto buňky spolu s dalšími v IPS-INH médiu zpasážovala 1:3 až 1:4. Po 4 dnech od pasáže se začaly objevovat malé kolonie s IPS-like morfologií (obrázek E). Zároveň s buňkami v IPS-INH podmínkách jsem pasážovala i diferencované buňky v IPS-PD médiu a druhý den po pasáži jim vyměnila médium za IPS-INH. I tyto buňky vytvořily během týdne kompaktní ploché iPS-like kolonie (obrázek F). Časový průběh přeprogramování PEFs je graficky znázorněn na schématu G. Šestijamkové destičky s vyvíjejícími se koloniemi byly v D37 přeprogramování zamrazeny.



**Panel 7:** Obrázky A-F ilustrují změny morfologie PEFs během přeprogramování. Jednotlivé obrázky jsou přiřazeny bodům na časové ose, která znázorňuje průběh přeprogramování.

## 7. Diskuze

Podařilo se mi vytvořit piPS-like buňky (dále piPSCs) nevirovou PiggyBac metodou z NSCs a PEFs. Pro vytvoření piPSCs byly úspěšně použity kombinace TFs OSKM a OSKML, přeprogramování pomocí miRNA úspěšné nebylo. OSKM a OSKML jsou tradičně používané TFs pro přeprogramování myších, lidských i prasečích buněk (Takahashi a Yamanaka 2006, Yu et al. 2007, Wu et al. 2009).

### 7.1 MiRNA pro vytváření savčích iPSCs

MiRNA klastru 302/367 vedly k úspěšnému přeprogramování lidských a myších somatických buněk (Anokye-Danso et al. 2011). Nebyly ale zatím použity pro vytvoření prasečích iPS buněk. MiRNA 302 jsou konzervovány minimálně u člověka, myši (Suh et al. 2004) a králíka (Maraghechi et al. 2013). Příbuzné miRNA s funkcí v raném embryonálním vývoji se nachází i u *X. Laevis* a *D. Rerio* (Rosa et al. 2009). U prasete zatím nebyl anotován miRNA klastr 302/367, není součástí chipu pro detekci prasečích miRNA

[\(http://www.lsciences.com/applications/transcriptomics/mirna-profiling/mirna/mirna-available-arrays/pig-array-content/\)](http://www.lsciences.com/applications/transcriptomics/mirna-profiling/mirna/mirna-available-arrays/pig-array-content/).

Je tedy možné, že tato skupina miRNA není u prasete konzervována. Transfekce NSCs a indukce exprese Cumátem ve dvou různých koncentracích (180 µg/ml a 300 µg/ml média) u nich nevedla k výrazným změnám morfologie během více než 30 dnů. IPS-INH médium rapidně snížilo schopnost proliferace těchto buněk, což také naznačuje, že u nich nedošlo k přeprogramování. Inhibitory PD a CHIR nepodporují proliferaci somatických buněk ani EpiSCs (Silva et al. 2008b)

### 7.2 Vektory typu PiggyBac

Nově jsem použila pro přeprogramování prasečích somatických buněk vektory typu PiggyBac, které již byly otestovány pro přeprogramování myších a lidských buněk (Woltjen et al. 2009, Yusa et al. 2009). Výhodou těchto vektorů je mimo možnosti zpětného vystřížení jejich vysoká kapacita, až 14 Kb (Li et al. 2011b), která umožní vnesení všech TFs v jedné kazetě. Ve vektorech použitých pro pokusy byly sekvence genů spojeny samoštěpicími 2A peptidy (Szymczak et al. 2004), které zajistí téměř stejnou expresi všech genů nezávisle na pořadí. Vnesení všech genů v jedné kazetě usnadňuje vystřížení transgenu z genomu. Průměrný počet kopií, které se do genomu integrují, závisí na množství integrovaného vektoru. V práci Yusa et al. měla relativně velká část přeprogramovaných kolonií integrované 2 kopie transgenu (20 % pokud bylo použito 2 µg plasmidu, 45 % pokud bylo použito 0,25 µg plasmidu). Kolonie s jednou kopií se objevily pouze v 1 % případů,

i při použití pouze 0,25 µg pDNA pro transfekci (Yusa et al. 2009). Přesto se jim podařilo PB kazetu z iPSCs vystříhnout.

PiggyBac transpozice vyžaduje pro aktivní začlenění PB kazety do genomu transientní expresi PB transpozázy (Hy). Není ale jednoznačné, jaký poměr integrativní vektor:vektor s Hy je pro integraci PB kazety optimální. Yusa et al. (2009) vytvořili linie iPSCs s integrovanou PB kazetou s vysokou účinností při použití 2 µg PB OSKM/L a 2 µg PB Hy plasmidu. Vzhledem k velikosti vektorů je v tomto případě molární poměr kolem 2:1 ve prospěch Hy. Jiná studie ale ukazuje, že účinnost transpozice se rapidně snižuje, pokud je poměr OSKM/L:Hy vyšší než 2:1 ve prospěch Hy (OSKM/L vektoru musí být minimálně dvakrát více) (Wu et al. 2006). Při první nukleofekci jsem použila vyšší podíl Hy ve shodě s prací Yusa et al., po přečtení této informace jsem množství Hy snížila. Integrace PB kazety do genomu iPSCs byla potvrzena pomocí genomické PCR pouze ve druhém případě (u prvního pokusu jsem neměla možnost integraci otestovat), molární poměr OSKM/L:Hy 2:1 je účinný pro integraci kazety do genomu a přeprogramování NSCs i PEFs. Bude tedy potřeba ověřit počet kopií PB kazety v jednotlivých liniích piPSCs pomocí Southern blotu a najít linii s 1 – 2 integracemi vhodnou pro vystřížení transgenu.

### 7.3 Metody transfekce

Při snaze vytvořit piPSCs z pNSCs bylo největší překážkou hledání vhodné metody transfekce. NSCs patří mezi obtížně transfekovatelné buňky. Pro vytváření iPS buněk jsou ale výhodným buněčným typem pro zavedení nových metod. Díky své vysoké proliferační schopnosti, epiteliálnímu fenotypu a expresi několika genů pluripotence – *Sox2*, a v menší míře i *Klf4* a *c-Myc*, je jejich přeprogramování efektivnější a rychlejší (Kim et al. 2009). Proto byly jedním z typů primárních buněk, které jsem použila pro vytvoření prasečích iPS buněk nevirovými PiggyBac vektory.

PEFs jsou více používaným typem primárních buněk pro přeprogramování. Jsou typem buněk, se kterými se snadno pracuje a většina metod transfekce je u nich vyzkoušená, proces přeprogramování je u nich ale delší a méně účinný.

Výběr správné metody transfekce je klíčový pro úspěch přeprogramování buněk nevirovými metodami. Retroviry a především lentiviry jsou velmi účinné v infekci cílových buněk, Silva et al. uvádí účinnost transdukce MEFs a myších NSCs 70 – 80 % (Silva et al. 2008b). Dosáhnout srovnatelné účinnosti jinými metodami transfekce je velmi obtížné. Pro přeprogramování, které má účinnost v řádech 0,01 – 4 % (přehled v Hochedlinger

a Plath 2009) je robustní metoda transfekce nezbytným předpokladem úspěchu. Retrovirové a lentivirové vektory byly zatím použity u většiny pokusů o přeprogramování prasečích somatických buněk do stavu pluripotence (Esteban et al. 2009, Ezashi et al. 2009, Wu et al. 2009, West et al. 2010).

Po neúspěšných pokusech s kalciumfosfátovou transfekcí a lipofekcí u NSCs jsem použila nukleofekci, která se ukázala být účinnou a robustní metodou pro transfekci NSCs i PEFs. Zhodnocení její účinnosti by bylo potřeba ještě ověřit větším počtem nezávislých transfekcí, zejména u PEFs kde byla zhodnocena pouze 1 jamka u každého vektoru. Přesto všechny vyzkoušené programy fungovaly velmi dobře a u PEFs fungoval i kit, který nebyl určen přímo pro nukleofekci embryonálních fibroblastů. Nukleofekce je tedy velmi flexibilní metodou nenáročnou na optimalizaci.

#### **7.4 Kultivační podmínky a transkripční faktory**

Pro přeprogramování NSCs i PEFs byly použity kombinace TFs OSKM a OSKML. Kombinace genů OSKML vedla k rychlejšímu a účinnějšímu přeprogramování NSCs než pouze OSKM. U PEFs nebyla účinnost přeprogramování zatím zhodnocena. Vyvíjející se kolonie z transfekovaných PEFs s morfologií ES-like buněk byly zamrazeny před izolací jednotlivých kolonií.

NSC-OSKML tvořily první kolonie o 2 - 3 dny dříve než NSC-OSKM. Celková účinnost jejich přeprogramování byla vyšší z hlediska počtu AP pozitivních kolonií a kolonie s OSKML kazetou také lépe udržovaly stabilní morfologii, pokud byly vystaveny diferenciačním signálům (PD), (diskutováno později).

Lin-28 (L) zvyšuje proliferativní schopnost buněk a blokuje tvorbu Let-7 miRNA, jejíž hladina se zvyšuje u diferencujících buněk (Hafner et al. 2013, Yu et al. 2007). Kombinace genů OSKM a OSKML pro přeprogramování myších fibroblastů použili i Yusa et al. (2009), z jejichž laboratoře jsme tyto plasmidy obdrželi. I oni uvádí asi dvojnásobné zvýšení v počtu kolonií přeprogramovaných OSKML oproti OSKM.

Hodnotila jsem zároveň celkový vliv kombinace pěti (IPS-INH médium) nebo šesti (IPS-PD médium) malých inhibičních molekul na účinnost přeprogramování a stabilitu morfologie piPSCs v kombinaci s použitou kombinací TFs. Všechny zvolené malé molekuly byly v různých kombinacích dříve použity pro zvýšení účinnosti přeprogramování nebo nahrazení některých z transkripčních faktorů (VPA, AZA, RepSox, TR) nebo pro přeprogramování iPSCs a ESCs do stavu naivní pluripotence (CHIR, PD) (shrnu

v Feng et al. 2009). Pro přípravu piPSCs nebyly zatím použity TR a RepSox, ale byl použit jiný inhibitor ALK5 receptoru A-83-01 (Telugu et al. 2010).

Vliv INH a PD podmínek jsem porovnávala pouze s kultivací v LIF. LIF, pokud nejsou inhibovány diferenciační signály MAPK dráhy, vede k diferenciaci většiny linií iPS buněk jiných druhů než myši. Pouze somatické buňky některých kmenů myši jsou ve standardních podmínkách kultivace přeprogramovány do naivního stavu pluripotence závislého na LIF (Nichols a Smith 2009).

Jak je popsáno v úvodu, LIF spouští u mESCs více signálních drah a v podmínkách kultivace bez inhibitorů je výsledkem jeho působení vyrovnávání prodiferenčních a protidiferenčních signálů (Niwa et al. 2009). Tento systém interakce mezi několika signálními drahami vede u mESCs/miPSCs ke stabilní sebeobnově stavu pluripotence. U dalších savců, ze kterých byly izolovány ESCs/iPSCs, LIF tuto schopnost nemá (shrnuje v Nichols et al. 2001). Stadium naivní pluripotence je u PSCs jiných savců velmi nestabilní, LIF má u těchto druhů i *in vivo* pouze krátkodobou roli během zahníždění blastocysty (Aghajanova 2004).

Definované 2i podmínky kultivace použité pro další stabilizaci naivního (nebo základního) stavu pluripotence u myši umožnily kultivaci naivních ESCs/iPSCs lidských a PSCs dalších druhů. K dlouhodobému udržení naivního stavu pluripotence v přítomnosti LIF je potřebná inhibice diferenciačních signálů MEK/ERK signalizace a posílení proliferační schopnosti buněk aktivací WNT signalizace (Ying et al. 2008).

Silva et al. (2008b) použili 2i/LIF podmínky pro dokončení přeprogramování do naivního stavu pluripotence částečně přeprogramovaných aNSCs. Uvedli zvýšení účinnosti přeprogramování aNSCs pokud byly CHIR a PD přidány do kultivace 3. den přeprogramování oproti 5. dnu. Já jsem přidala inhibitory do média 4. den přeprogramování, kdy již byly vidět první malé kolonie s ES-like morfologií, zejména u OSKM transfekovaných NSCs, ale vzhledem k nízkému počtu buněk použitých pro přeprogramování jich nebylo mnoho a většina shluků buněk ještě neměla příliš pravidelnou morfologii (obrázky B, C panelu 2). Použila jsem více inhibičních molekul, ale všechny byly dříve použity pro přeprogramování buněk v pre-iPS stavu a některé i v dřívějších fázích přeprogramování. VPA a AZA byly také použity u částečně přeprogramovaných fibroblastů (Huangfu et al. 2008b). Zatímco VPA i AZA mají potenciál zvýšit účinnost přeprogramování až 50krát i pokud je použita klasická kombinace OSKM (Huangfu et al. 2008b), RepSox má pozitivní vliv na účinnost tvorby kolonií spíše pokud nahrazuje *c-Myc* a/nebo *Sox2*. Jeho vliv na přeprogramování buněk pomocí OSKM/L je relativně malý, méně než dvojnásobné zvýšení účinnosti (Ichida et al. 2009).

Výsledkem našeho pokusu byla nižší účinnost přeprogramování OSKM-INH kombinace než OSKM-LIF asi o 50 %. U OSKM-LIF bylo AP pozitivních více kolonií, ale vzhledem k pouze jednomu opakování experimentu nelze tento výsledek statisticky vyhodnotit. INH médium bylo aplikováno pravděpodobně příliš brzy a zejména OSKM transfekované buňky tak ještě nedosáhly dostatečného stupně dediferenciace, aby vliv INH podmínek podpořil dokončení přeprogramování. INH podmínky u nich spíše dočasně snížily schopnost proliferace. Je také možné, že negativní efekt na účinnost přeprogramování u OSKM transfekovaných NSCs je způsoben kombinací těchto molekul a bylo by dobré otestovat působení těchto molekul jednotlivě.

NSC-OSKM byly celkově přeprogramovány s výrazně vyšší účinností než NSC-OSKM. Nejvýraznější byl tento efekt u buněk kultivovaných v IPS-PD médiu, které vedlo obecně k diferenciaci většiny vyvíjejících se kolonií. Kombinace genů OSKM dokázala částečně této diferenciaci zabránit, kolonií vzniklo asi třikrát více než NSC-OSKM v IPS-PD médiu. PD byl v kultivaci pouze 3 dny, potom bylo médium opět vyměněno za IPS-INH, přesto rapidně snížil počet vzniklých pluripotentních kolonií (viz Tabulka 2). Inhibice MEK/ERK vlivem PD vedla k diferenciaci velké části kolonií. Byl pravděpodobně přes viditelné morfologické změny NSCs přidán příliš brzy. NSCs jsou závislé na bFGF, který spouští MAPK signalizaci (Glaser et al. 2007), pokud ještě nebyly schopné v reakci na inhibici MEK/ERK aktivovat LIF/STAT3 signalizaci, vedla tato inhibice k jejich diferenciaci.

Přesto, že kolonie s morfologií pluripotentních buněk byly izolovány ze všech kultivačních podmínek, pouze kolonie kultivované v IPS-INH médiu si stabilní morfologii dokázaly udržet i během prvních pasáží (Panel 3 A, B). Kolonie v IPS-LIF podmínkách začaly během jednoho týdne od výskytu prvních kolonií masivně diferencovat do TE (Panel 2 C). Ojedinelá diferenciaci do TE se objevila i u kolonií kultivovaných v IPS-INH podmínkách, většina kolonií si ale stabilní morfologii bez tendence k diferenciaci udržela.

Asi tři desítky primárních linií piPSCs kultivovaných v inhibičních podmínkách udržovaly stabilní morfologii a stabilně se množily, přesto nedosáhly 3D morfologie typické pro mESC a udržovaly si stále plochou morfologii. Právě PD inhibitor by měl vést k dosažení morfologie a stavu pluripotence bližšímu mESC. Před jeho opětovným přidáním do média chtěla autorka vytvořit primární linie iPSCs se stabilní morfologií a testovat jeho účinky jen na části piPSCs každé linie. Kultivace v PD podmínkách bude dále testována. Prozatím byla kultivace přerušena ve druhé nebo třetí pasáži u všech linií piPSCs.



## 7.5 Přeprogramování PEFs

PEFs byly rovněž přeprogramovány do piPS-like buněk. Změny morfologie PEFs transfekovaných OSKM (PEF-OSKM) i PEFs transfekovaných OSKML (PEF-OSKML) se objevovaly později, po 2 – 3 týdnech od transfekce. IPS-INH médium bylo přidáno D18. Kolonie s hladkými okraji a malými těsně nahloučenými buňkami se objevily až po pasáži PEF-OSKM/L 4 týdny od začátku přeprogramování v IPS-INH podmínkách kultivace. Tyto kolonie ale zatím nebyly izolovány.

Aplikace IPS-PD média D18 měla na PEF-OSKM/L stejný vliv jako na NSCs. Zablokování MEK/ERK signalizace vedlo k diferenciaci pravděpodobně ještě nedostatečně přeprogramovaných PEFs do neuronální linie. Médium s PD působilo na PEFs také pouze 3 dny a bylo vyměněno za IPS-INH. Diferencované buňky se nepodařilo izolovat na sklíčko a identifikovat, fenotypově ale připomínaly neurony. Pokud se toto pozorování podaří potvrdit v dalších experimentech a prokázat neuronální charakteristiku pozorovaných buněk, šlo by o zajímavé doplnění již existujících transdiferenciačních protokolů. Existující transdiferenciační protokoly pro přímou diferenciaci fibroblastů do neuronů bez nutnosti přechodu přes pluripotentní stádium využívají několika transkripčních faktorů, podobně jako při přeprogramování somatických buněk do stavu pluripotence. Transdiferenciací je možné získat neurony během 15 dnů (Meng et al. 2012). Nevýhodou transdiferenciace oproti přechodu přes stav pluripotence je v našem případě nemožnost vystřížení vnesené PiggyBac kazety v nervových buňkách, navíc tento proces je vždy jednorázový. Pro každou transdiferenciaci je potřeba nová izolace fibroblastů. Vytvoření iPSCs je výhodnější kvůli možnostem manipulace s buňkami ve stavu pluripotence díky jejich neomezené schopnosti proliferace. Zároveň iPS buňky mohou být uchovány a sloužit jakodlouhodobá zásoba pro diferenciaci vyžadující srovnání mezi pokusy.

## 7.6 Charakterizace piPSCs připravených z NSCs

Primární linie piPSCs vytvořené z NSCs zatím nebyly náležitě charakterizovány a proto můžeme zatím hovořit pouze o iPS-like buňkách. Nebyla u nich vyhodnocena většina znaků pluripotentních iPSCs/ESCs. Vlastnostmi společnými s iPS buňkami jsou morfologie, která je udržována v INH podmínkách, ale nikoli v podmínkách pouze s LIF, a aktivita alkalické fosfatázy. Bude potřeba potvrdit závislost těchto buněk na LIF. Jednak jejich kultivací bez LIF a také inhibicí JAK signalizace, která je jinak LIF spouštěna a je esenciální pro udržení sebeobnovy mESCs (Matsuda et al. 1999). Závislost piPSCs na JAK/STAT3 signalizací by potvrdila dosažení naivního stavu pluripotence.



Dalším důležitým krokem bude ověření exprese markerů pluripotence na úrovni mRNA i proteinů. Testováním exprese mRNA genů pluripotence lze na rozdíl od většiny proteinů, které jsou více konzervované, rozlišit druhově specifické transkripty a ukázat jakou mírou se podílí na expresi genů pluripotence endogenní TFs v porovnání s expresí z transgenního promotoru. Pro vytvoření našich iPS-like buněk byly použity vektory s myšími sekvencemi genů *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc* a *Lin28*. Funkce těchto genů je u savců konzervována (Fernandez-Tresguerres et al. 2010) a myší sekvence již byly úspěšně použity pro přeprogramování prasečích buněk do stavu pluripotence (Esteban et al. 2009). Jejich výhodou je právě možnost rozlišit prasečí endogenní a myší transgenní transkripty.

### 7.7 Potenciál HD-piPSCs pro modelování HD

U primárních buněk použitých pro přeprogramování byla potvrzena přítomnost N-terminální části lidského mutovaného HTT. HTT transgen je přítomen i u piPSCs připravených z NSCs. Zbývá potvrdit, že je tento transgen v piPSCs i exprimován a v jaké míře. Důležité bude také zhodnocení exprese transgenu v buňkách diferencovaných do neuroektodermální linie. Fenotyp HD byl pozorován nejen na úrovni neuronů, ale také u mNSCs izolovaných z myšího modelu HD (Ritch et al. 2012) a astrocytů (Juopperi et al. 2012). Přitom u NSCs by byl výhodou pro charakterizaci fenotypu HD jejich proliferační potenciál a celkově jednodušší kultivace. Vystřížení PB kazety by mělo zajistit neomezenou schopnost diferenciaci piPSCs do linií všech tří zárodečných vrstev. Navíc, některé studie ukazují, že si iPSCs zachovávají v raných pasážích epigenetickou paměť (Kim et al. 2010) původního buněčného typu. Pro piPSCs vytvořených z NSCs by mělo být snazší diferencovat do neuroektodermu. Až diferenciaci piPSCs vytvořených z PEFs do neuroektodermální linie by měla prokázat plný potenciál iPSCs diferencovat do tkání všech zárodečných linií.

Vliv Huntingtinu na neurony se projevuje *in vivo* (u lidských pacientů) v dospělosti po 35. roce života. Primární buňky pro vytvoření HD-iPSCs byly izolovány ze 40 denních prasečích fětů, v tomto stadiu vývoje se nemoc ještě neprojevuje. Přestože 124 opakování CAG repetic ve vloženém transgenu odpovídá spíše juvenilní formě HD, která se projevuje již u dětí (Vargas et al. 2003). Použití většího počtu CAG repetic je ale běžné u většiny zvířecích modelů HD (Wang a Qin 2006). Náš prasečí model HD ještě nebyl plně charakterizován a zatím prvním pozorovaným znakem HD na úrovni mozkové tkáně byl snížený počet DARPP32 pozitivních neuronů u 16 měsíců starých transgenních miniprasat F2 generace (Baxa et al. 2013).

Přeprogramování buněk do stavu pluripotence má vliv i na metabolismus buněk a produkci kyslíkových radikálů mitochondriemi, vede k jejich omlazení. Snížena je zároveň

úroveň poškození DNA (Prigione et al. 2010, Prigione et al. 2011). Takže i pokud bychom pro přeprogramování použili dermální fibroblasty z kožních biopsií transgenních prasat, pravděpodobně nebudou neurony přímo diferencované z HD-piPSCs projevovat známky HD. Pro modelování projevů HD bude pravděpodobně potřeba dlouhodobější kultivace NSCs nebo jiných nervových prekursorů diferencovaných z piPSCs pro jejich zestárnutí a kumulaci buněčného stresu, který povede k projevu fenotypu HD v *in vitro* diferencovaných neuronech.

## 8. Závěr

1. Vyhodnotila jsem účinnost různých metod transfekce NSCs. Jako nejúčinnější se ukázala nukleofekce.
2. Vytvořila jsem primární linie piPS-like buněk s integrovaným HTT transgenem nevirovými PiggyBac transpozony.
3. Zhodnotila jsem vliv různých kultivačních podmínek a použitých transkripčních faktorů na rychlost a účinnost přeprogramování a stabilitu morfologie piPSCs.
4. Potvrdila jsem aktivitu alkalické fosfatázy piPSCs a integraci PiggyBac kazety do genomu piPSCs. Podařilo se mi také potvrdit integraci Htt transgenu do genomu piPSCs.

## 9. Seznam literatury

- Aghajanova, Lusine. 2004. „Leukemia Inhibitory Factor and Human Embryo Implantation". *Annals of the New York Academy of Sciences* 1034 (prosinec): 176–183. doi:10.1196/annals.1335.020.
- Aigner, Bernhard, Simone Renner, Barbara Kessler, Nikolai Klymiuk, Mayuko Kurome, Annegret Wünsch, a Eckhard Wolf. 2010. „Transgenic Pigs as Models for Translational Biomedical Research". *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 88 (7) (červenec): 653–664. doi:10.1007/s00109-010-0610-9.
- Alberio, Ramiro, Nicola Croxall, a Cinzia Allegrucci. 2010. „Pig Epiblast Stem Cells Depend on Activin/nodal Signaling for Pluripotency and Self-renewal". *Stem Cells and Development* 19 (10) (říjen): 1627–1636. doi:10.1089/scd.2010.0012.
- An, Mahru C, Ningzhe Zhang, Gary Scott, Daniel Montoro, Tobias Wittkop, Sean Mooney, Simon Melov, a Lisa M Ellerby. 2012. „Genetic Correction of Huntington's Disease Phenotypes in Induced Pluripotent Stem Cells". *Cell Stem Cell* 11 (2) (srpen 3): 253–263. doi:10.1016/j.stem.2012.04.026.
- Anderson, Philip D, Vicki R Nelson, Paul J Tesar, a Joseph H Nadeau. 2009. „Genetic Factors on Mouse Chromosome 18 Affecting Susceptibility to Testicular Germ Cell Tumors and Permissiveness to Embryonic Stem Cell Derivation". *Cancer Research* 69 (23) (prosinec 1): 9112–9117. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3342.
- Anokye-Danso, Frederick, Chinmay M Trivedi, Denise Juhr, Mudit Gupta, Zheng Cui, Ying Tian, Yuzhen Zhang, et al. 2011. „Highly Efficient miRNA-mediated Reprogramming of Mouse and Human Somatic Cells to Pluripotency". *Cell Stem Cell* 8 (4) (duben 8): 376–388. doi:10.1016/j.stem.2011.03.001.
- Araki, Ryoko, Masahiro Uda, Yuko Hoki, Misato Sunayama, Miki Nakamura, Shunsuke Ando, Mayumi Sugiura, et al. 2013. „Negligible Immunogenicity of Terminally Differentiated Cells Derived from Induced Pluripotent or Embryonic Stem Cells". *Nature* 494 (7435) (únor 7): 100–104. doi:10.1038/nature11807.
- Avilion, Ariel A, Silvia K Nicolis, Larysa H Pevny, Lidia Perez, Nigel Vivian, a Robin Lovell-Badge. 2003. „Multipotent Cell Lineages in Early Mouse Development Depend on SOX2 Function". *Genes & Development* 17 (1) (leden 1): 126–140. doi:10.1101/gad.224503.
- Battle-Morera, Laura, Austin Smith, a Jennifer Nichols. 2008. „Parameters Influencing Derivation of Embryonic Stem Cells from Murine Embryos". *Genesis (New York, N.Y.: 2000)* 46 (12) (prosinec): 758–767. doi:10.1002/dvg.20442.
- Beattie, Gillian M, Ana D Lopez, Nathan Bucay, Andrew Hinton, Meri T Firpo, Charles C King, a Alberto Hayek. 2005. „Activin A Maintains Pluripotency of Human Embryonic Stem Cells in the Absence of Feeder Layers". *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 23 (4) (duben): 489–495. doi:10.1634/stemcells.2004-0279.
- Becker, Nilson, Renato P Munhoz, Salmo Raskin, Lineu César Werneck, a Hélio A G Teive. 2007. „Non-choreic Movement Disorders as Initial Manifestations of Huntington's Disease". *Arquivos de Neuro-psiquiatria* 65 (2B) (červen): 402–405.
- Beddington, R S, a E J Robertson. 1989. „An Assessment of the Developmental Potential of Embryonic Stem Cells in the Midgestation Mouse Embryo". *Development (Cambridge, England)* 105 (4) (duben): 733–737.
- Berardelli, A., J. C. Rothwell, P. D. Thompson, a M. Hallett. 2001. „Pathophysiology of Bradykinesia in Parkinson's Disease". *Brain* 124 (11) (leden 11): 2131–2146. doi:10.1093/brain/124.11.2131.
- Bernstein, Bradley E., Michael Kamal, Kerstin Lindblad-Toh, Stefan Bekiranov, Dione K. Bailey, Dana J. Huebert, Scott McMahon, et al. 2005. „Genomic Maps and Comparative Analysis of Histone Modifications in Human and Mouse". *Cell* 120 (2) (leden 28): 169–181. doi:10.1016/j.cell.2005.01.001.
- Blauwkamp, Timothy A, Shelly Nigam, Reza Ardehali, Irving L Weissman, a Roel Nusse. 2012. „Endogenous Wnt Signalling in Human Embryonic Stem Cells Generates an

- Equilibrium of Distinct Lineage-specified Progenitors". *Nature Communications* 3: 1070. doi:10.1038/ncomms2064.
- Blomberg, Le Ann, Lori L Schreier, a Neil C Talbot. 2008. „Expression analysis of pluripotency factors in the undifferentiated porcine inner cell mass and epiblast during in vitro culture". *Molecular reproduction and development* 75 (3) (březen): 450–463. doi:10.1002/mrd.20780.
- Boué, Stéphanie, Ida Paramonov, María José Barrero, a Juan Carlos Izpisua Belmonte. 2010. „Analysis of Human and Mouse Reprogramming of Somatic Cells to Induced Pluripotent Stem Cells. What Is in the Plate?" *PloS One* 5 (9). doi:10.1371/journal.pone.0012664.
- Boyer, Laurie A, Tong Ihn Lee, Megan F Cole, Sarah E Johnstone, Stuart S Levine, Jacob P Zucker, Matthew G Guenther, et al. 2005. „Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells". *Cell* 122 (6) (září 23): 947–956. doi:10.1016/j.cell.2005.08.020.
- Brevini, Tiziana A L, Valentina Tosetti, Mattia Crestan, Stefania Antonini, a Fulvio Gandolfi. 2007. „Derivation and Characterization of Pluripotent Cell Lines from Pig Embryos of Different Origins". *Theriogenology* 67 (1) (leden 1): 54–63. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.09.019.
- Brons, I Gabrielle M, Lucy E Smithers, Matthew W B Trotter, Peter Rugg-Gunn, Bowen Sun, Susana M Chuva de Sousa Lopes, Sarah K Howlett, et al. 2007. „Derivation of Pluripotent Epiblast Stem Cells from Mammalian Embryos". *Nature* 448 (7150) (červenec 12): 191–195. doi:10.1038/nature05950.
- Brown, Stephanie, Adrian Teo, Siim Pauklin, Nicholas Hannan, Candy H-H Cho, Bing Lim, Leah Vardy, et al. 2011. „Activin/Nodal Signaling Controls Divergent Transcriptional Networks in Human Embryonic Stem Cells and in Endoderm Progenitors". *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 29 (8) (srpen): 1176–1185. doi:10.1002/stem.666.
- Bryja, Vítězslav, Sonia Bonilla, a Ernest Arenas. 2006. „Derivation of Mouse Embryonic Stem Cells". *Nature Protocols* 1 (4): 2082–2087. doi:10.1038/nprot.2006.355.
- Byers, Blake, Hsiao-lu Lee, a Renee Reijo Pera. 2012. „Modeling Parkinson's Disease Using Induced Pluripotent Stem Cells". *Current Neurology and Neuroscience Reports* 12 (3) (červen): 237–242. doi:10.1007/s11910-012-0270-y.
- Cai, Liuhong, Zhaohui Ye, Betty Ying Zhou, Prashant Mali, Canquan Zhou, a Linzhao Cheng. 2007. „Promoting Human Embryonic Stem Cell Renewal or Differentiation by Modulating Wnt Signal and Culture Conditions". *Cell Research* 17 (1) (leden): 62–72. doi:10.1038/sj.cr.7310138.
- Camnasio, Stefano, Alessia Delli Carri, Angelo Lombardo, Iwona Grad, Caterina Mariotti, Alessia Castucci, Björn Rozell, et al. 2012. „The First Reported Generation of Several Induced Pluripotent Stem Cell Lines from Homozygous and Heterozygous Huntington's Disease Patients Demonstrates Mutation Related Enhanced Lysosomal Activity". *Neurobiology of Disease* 46 (1) (duben): 41–51. doi:10.1016/j.nbd.2011.12.042.
- Cao, Shanbo, Fang Wang, Zhisheng Chen, Zhong Liu, Cheng Mei, Haojia Wu, Junjiu Huang, Chao Li, Lingjun Zhou, a Lin Liu. 2009. „Isolation and Culture of Primary Bovine Embryonic Stem Cell Colonies by a Novel Method". *Journal of Experimental Zoology. Part A, Ecological Genetics and Physiology* 311 (5) (červen 1): 368–376. doi:10.1002/jez.535.
- Cattaneo, E, D Rigamonti, D Goffredo, C Zuccato, F Squitieri, a S Sipione. 2001. „Loss of normal huntingtin function: new developments in Huntington's disease research". *Trends in neurosciences* 24 (3) (březen): 182–188.
- Cisbani, G, a F Cicchetti. 2012. „An in vitro perspective on the molecular mechanisms underlying mutant huntingtin protein toxicity". *Cell death & disease* 3: e382. doi:10.1038/cddis.2012.121.

- Clabough, Erin B D. 2013. „Huntington’s Disease: The Past, Present, and Future Search for Disease Modifiers”. *The Yale Journal of Biology and Medicine* 86 (2) (červen): 217–233.
- Cockburn, Katie, a Janet Rossant. 2010. „Making the blastocyst: lessons from the mouse”. *Journal of Clinical Investigation* 120 (4) (duben 1): 995–1003. doi:10.1172/JCI41229.
- Dahéron, Laurence, Sarah L Opitz, Holm Zaehres, M William Lensch, William M Lensch, Peter W Andrews, Joseph Itskovitz-Eldor, a George Q Daley. 2004. „LIF/STAT3 Signaling Fails to Maintain Self-renewal of Human Embryonic Stem Cells”. *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 22 (5): 770–778. doi:10.1634/stemcells.22-5-770.
- Darr, Henia, Yoav Mayshar, a Nissim Benvenisty. 2006. „Overexpression of NANOG in Human ES Cells Enables Feeder-free Growth While Inducing Primitive Ectoderm Features”. *Development (Cambridge, England)* 133 (6) (březen): 1193–1201. doi:10.1242/dev.02286.
- Davidson, Kathryn C., Allison M. Adams, Jamie M. Goodson, Circe E. McDonald, Jennifer C. Potter, Jason D. Berndt, Travis L. Biechele, Russell J. Taylor, a Randall T. Moon. 2012. „Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling Promotes Differentiation, Not Self-renewal, of Human Embryonic Stem Cells and Is Repressed by Oct4”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (březen 5). doi:10.1073/pnas.1118777109. <http://www.pnas.org/content/early/2012/02/28/1118777109>.
- De Los Angeles, Alejandro, Yuin-Han Loh, Paul J Tesar, a George Q Daley. 2012. „Accessing naïve human pluripotency”. *Current opinion in genetics & development* 22 (3) (červen): 272–282. doi:10.1016/j.gde.2012.03.001.
- Delghandi, Marit Pedersen, Mona Johannessen, a Ugo Moens. 2005. „The cAMP Signalling Pathway Activates CREB through PKA, P38 and MSK1 in NIH 3T3 Cells”. *Cellular Signalling* 17 (11) (listopad): 1343–1351. doi:10.1016/j.cellsig.2005.02.003.
- Djuric, Ugljesa, a James Ellis. 2010. „Epigenetics of Induced Pluripotency, the Seven-headed Dragon”. *Stem Cell Research & Therapy* 1 (1): 3. doi:10.1186/scrt3.
- Doetschman, T C, H Eistetter, M Katz, W Schmidt, a R Kemler. 1985. „The in Vitro Development of Blastocyst-derived Embryonic Stem Cell Lines: Formation of Visceral Yolk Sac, Blood Islands and Myocardium”. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 87 (červen): 27–45.
- Dravid, Gautam, Zhaohui Ye, Holly Hammond, Guibin Chen, April Pyle, Peter Donovan, Xiaobing Yu, a Linzhao Cheng. 2005. „Defining the Role of Wnt/beta-catenin Signaling in the Survival, Proliferation, and Self-renewal of Human Embryonic Stem Cells”. *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 23 (10) (prosinec): 1489–1501. doi:10.1634/stemcells.2005-0034.
- Du Puy, Leonie, Susana M Chuva de Sousa Lopes, Henk P Haagsman, a Bernard A J Roelen. 2011. „Analysis of Co-expression of OCT4, NANOG and SOX2 in Pluripotent Cells of the Porcine Embryo, in Vivo and in Vitro”. *Theriogenology* 75 (3) (únor): 513–526. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.09.019.
- Ellis, J, a M Bhatia. 2011. „iPSC Technology: Platform for Drug Discovery. Point”. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 89 (5) (květen): 639–641. doi:10.1038/clpt.2011.22.
- Esteban, Miguel A, Jianyong Xu, Jiayin Yang, Meixiu Peng, Dajiang Qin, Wen Li, Zhuoxin Jiang, et al. 2009. „Generation of Induced Pluripotent Stem Cell Lines from Tibetan Miniature Pig”. *The Journal of Biological Chemistry* 284 (26) (červen 26): 17634–17640. doi:10.1074/jbc.M109.008938.
- Evans, M J, a M H Kaufman. 1981. „Establishment in Culture of Pluripotential Cells from Mouse Embryos”. *Nature* 292 (5819) (červenec 9): 154–156.
- Ezashi, Toshihiko, Bhanu Prakash V L Telugu, Andrei P Alexenko, Shrikesh Sachdev, Sunilima Sinha, a R Michael Roberts. 2009. „Derivation of Induced Pluripotent Stem Cells from Pig Somatic Cells”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (27) (červenec 7): 10993–10998. doi:10.1073/pnas.0905284106.

- Fan, Nana, Jijun Chen, Zhouchun Shang, Hongwei Dou, Guangzhen Ji, Qingjian Zou, Lu Wu, et al. 2013. „Piglets Cloned from Induced Pluripotent Stem Cells". *Cell Research* 23 (1) (leden): 162–166. doi:10.1038/cr.2012.176.
- Feng, Bo, Jia-Hui Ng, Jian-Chien Dominic Heng, a Huck-Hui Ng. 2009. „Molecules That Promote or Enhance Reprogramming of Somatic Cells to Induced Pluripotent Stem Cells". *Cell Stem Cell* 4 (4) (duben 3): 301–312. doi:10.1016/j.stem.2009.03.005.
- Fernandez-Tresguerres, Beatriz, Susana Cañon, Teresa Rayon, Barbara Pernaute, Miguel Crespo, Carlos Torroja, a Miguel Manzanares. 2010. „Evolution of the Mammalian Embryonic Pluripotency Gene Regulatory Network". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (46) (listopad 16): 19955–19960. doi:10.1073/pnas.1010708107.
- Fujishiro, Shuh-hei, Kazuaki Nakano, Yoshihisa Mizukami, Takuya Azami, Yoshikazu Arai, Hitomi Matsunari, Rikiya Ishino, et al. 2013. „Generation of Naive-like Porcine-induced Pluripotent Stem Cells Capable of Contributing to Embryonic and Fetal Development". *Stem Cells and Development* 22 (3) (únor 1): 473–482. doi:10.1089/scd.2012.0173.
- Gil, Joana M, a Ana Cristina Rego. 2008. „Mechanisms of Neurodegeneration in Huntington's Disease". *The European Journal of Neuroscience* 27 (11) (červen): 2803–2820. doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06310.x.
- Glaser, Tamara, Steven M Pollard, Austin Smith, a Oliver Brüstle. 2007. „Tripotential Differentiation of Adherently Expandable Neural Stem (NS) Cells". *PloS One* 2 (3): e298. doi:10.1371/journal.pone.0000298.
- Gore, Athurva, Zhe Li, Ho-Lim Fung, Jessica Young, Suneet Agarwal, Jessica Antosiewicz-Bourget, Isabel Canto, et al. 2011. „Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells". *Nature* 471 (7336) (březen 3): 63–67. doi:10.1038/nature09805.
- Grabundzija, Ivana, Jichang Wang, Attila Sebe, Zsuzsanna Erdei, Robert Kajdi, Anantharam Devaraj, Doris Steinemann, et al. 2013. „Sleeping Beauty Transposon-based System for Cellular Reprogramming and Targeted Gene Insertion in Induced Pluripotent Stem Cells". *Nucleic Acids Research* 41 (3) (únor 1): 1829–1847. doi:10.1093/nar/gks1305.
- Greber, Boris, Hans Lehrach, a James Adjaye. 2007. „Fibroblast Growth Factor 2 Modulates Transforming Growth Factor Beta Signaling in Mouse Embryonic Fibroblasts and Human ESCs (hESCs) to Support hESC Self-renewal". *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 25 (2) (únor): 455–464. doi:10.1634/stemcells.2006-0476.
- Grönroos, Eva, Isabel J Kingston, Anassuya Ramachandran, Rebecca A Randall, Pedro Vizán, a Caroline S Hill. 2012. „Transforming Growth Factor  $\beta$  Inhibits Bone Morphogenetic Protein-induced Transcription through Novel Phosphorylated Smad1/5-Smad3 Complexes". *Molecular and Cellular Biology* 32 (14) (červenec): 2904–2916. doi:10.1128/MCB.00231-12.
- Grskovic, Marica, Ashkan Javaherian, Berta Strulovici, a George Q Daley. 2011. „Induced Pluripotent Stem Cells--opportunities for Disease Modelling and Drug Discovery". *Nature Reviews. Drug Discovery* 10 (12) (prosinec): 915–929. doi:10.1038/nrd3577.
- Guha, Prajna, John W Morgan, Gustavo Mostoslavsky, Neil P Rodrigues, a Ashleigh S Boyd. 2013. „Lack of Immune Response to Differentiated Cells Derived from Syngeneic Induced Pluripotent Stem Cells". *Cell Stem Cell* 12 (4) (duben 4): 407–412. doi:10.1016/j.stem.2013.01.006.
- Gunaseeli, I, M X Doss, C Antzelevitch, J Hescheler, a A Sachinidis. 2010. „Induced Pluripotent Stem Cells as a Model for Accelerated Patient- and Disease-specific Drug Discovery". *Current Medicinal Chemistry* 17 (8): 759–766.
- Guo, Ge, Jian Yang, Jennifer Nichols, John Simon Hall, Isobel Eyres, William Mansfield, a Austin Smith. 2009. „Klf4 Reverts Developmentally Programmed Restriction of Ground State Pluripotency". *Development (Cambridge, England)* 136 (7) (duben): 1063–1069. doi:10.1242/dev.030957.

- Hafner, Markus, Klaas E. A. Max, Pradeep Bandaru, Pavel Morozov, Stefanie Gerstberger, Miguel Brown, Henrik Molina, a Thomas Tuschl. 2013. „Identification of mRNAs Bound and Regulated by Human LIN28 Proteins and Molecular Requirements for RNA Recognition". *RNA* (březen 12). doi:10.1261/rna.036491.112. <http://rnajournal.cshlp.org/content/early/2013/03/12/rna.036491.112>.
- Hall, V, K Hinrichs, G Lazzari, D H Betts, a P Hyttel. 2013. „Early Embryonic Development, Assisted Reproductive Technologies, and Pluripotent Stem Cell Biology in Domestic Mammals". *Veterinary Journal (London, England: 1997)* (červen 26). doi:10.1016/j.tvjl.2013.05.026.
- Hall, Vanessa Jane. 2012. „Early Development of the Porcine Embryo: The Importance of Cell Signalling in Development of Pluripotent Cell Lines". *Reproduction, Fertility, and Development* 25 (1): 94–102. doi:10.1071/RD12264.
- Hanna, Jacob, Albert W Cheng, Krishanu Saha, Jongpil Kim, Christopher J Lengner, Frank Soldner, John P Cassady, Julien Muffat, Bryce W Carey, a Rudolf Jaenisch. 2010. „Human Embryonic Stem Cells with Biological and Epigenetic Characteristics Similar to Those of Mouse ESCs". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (20) (květen 18): 9222–9227. doi:10.1073/pnas.1004584107.
- Hanna, Jacob, Styliani Markoulaki, Maisam Mitalipova, Albert W Cheng, John P Cassady, Judith Staerk, Bryce W Carey, et al. 2009. „Metastable Pluripotent States in NOD-mouse-derived ESCs". *Cell Stem Cell* 4 (6) (červen 5): 513–524. doi:10.1016/j.stem.2009.04.015.
- Hanna, Jacob, Styliani Markoulaki, Patrick Schorderet, Bryce W Carey, Caroline Beard, Marius Wernig, Menno P Creyghton, et al. 2008. „Direct Reprogramming of Terminally Differentiated Mature B Lymphocytes to Pluripotency". *Cell* 133 (2) (duben 18): 250–264. doi:10.1016/j.cell.2008.03.028.
- Hanna, Jacob, Krishanu Saha, Bernardo Pando, Jeroen van Zon, Christopher J Lengner, Menno P Creyghton, Alexander van Oudenaarden, a Rudolf Jaenisch. 2009. „Direct Cell Reprogramming Is a Stochastic Process Amenable to Acceleration". *Nature* 462 (7273) (prosinec 3): 595–601. doi:10.1038/nature08592.
- Hanna, Jacob, Marius Wernig, Styliani Markoulaki, Chiao-Wang Sun, Alexander Meissner, John P Cassady, Caroline Beard, et al. 2007. „Treatment of Sick Cell Anemia Mouse Model with iPS Cells Generated from Autologous Skin". *Science (New York, N.Y.)* 318 (5858) (prosinec 21): 1920–1923. doi:10.1126/science.1152092.
- Haraguchi, Seiki, Kazuhiro Kikuchi, Michiko Nakai, a Tomoyuki Tokunaga. 2012. „Establishment of Self-renewing Porcine Embryonic Stem Cell-like Cells by Signal Inhibition". *The Journal of Reproduction and Development* 58 (6): 707–716.
- Hatoya, Shingo, Ryuzo Torii, Yasushi Kondo, Tsuyoshi Okuno, Kinji Kobayashi, Viskam Wijewardana, Noritoshi Kawate, et al. 2006. „Isolation and Characterization of Embryonic Stem-like Cells from Canine Blastocysts". *Molecular Reproduction and Development* 73 (3): 298–305. doi:10.1002/mrd.20392.
- Hayashi, Katsuhiko, Susana M Chuva de Sousa Lopes, Fuchou Tang, a M Azim Surani. 2008. „Dynamic Equilibrium and Heterogeneity of Mouse Pluripotent Stem Cells with Distinct Functional and Epigenetic States". *Cell Stem Cell* 3 (4) (říjen 9): 391–401. doi:10.1016/j.stem.2008.07.027.
- HD iPSC Consortium. 2012. „Induced Pluripotent Stem Cells from Patients with Huntington's Disease Show CAG-repeat-expansion-associated Phenotypes". *Cell Stem Cell* 11 (2) (srpen 3): 264–278. doi:10.1016/j.stem.2012.04.027.
- Henderson, J K, J S Draper, H S Baillie, S Fishel, J A Thomson, H Moore, a P W Andrews. 2002. „Preimplantation Human Embryos and Embryonic Stem Cells Show Comparable Expression of Stage-specific Embryonic Antigens". *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 20 (4): 329–337. doi:10.1634/stemcells.20-4-329.
- Hochedlinger, Konrad, a Kathrin Plath. 2009. „Epigenetic Reprogramming and Induced Pluripotency". *Development* 136 (4) (únor 15): 509–523. doi:10.1242/dev.020867.

- Honda, Arata, Michiko Hirose, a Atsuo Ogura. 2009. „Basic FGF and Activin/Nodal but Not LIF Signaling Sustain Undifferentiated Status of Rabbit Embryonic Stem Cells". *Experimental Cell Research* 315 (12) (červenec 15): 2033–2042. doi:10.1016/j.yexcr.2009.01.024.
- Hotta, Akitsu, a James Ellis. 2008. „Retroviral Vector Silencing During iPS Cell Induction: An Epigenetic Beacon That Signals Distinct Pluripotent States". *Journal of Cellular Biochemistry* 105 (4) (listopad 1): 940–948. doi:10.1002/jcb.21912.
- Hsieh, Ya-Chen, Payungsuk Intawicha, Kun-Hsiung Lee, Yung-Tsung Chiu, Neng-Wen Lo, a Jyh-Cherng Ju. 2011. „LIF and FGF Cooperatively Support Stemness of Rabbit Embryonic Stem Cells Derived from Parthenogenetically Activated Embryos". *Cellular Reprogramming* 13 (3) (červen): 241–255. doi:10.1089/cell.2010.0097.
- Huang, Lizhen, Nana Fan, Jie Cai, Dongshan Yang, Bentian Zhao, Zhen Ouyang, Weiwang Gu, a Liangxue Lai. 2011. „Establishment of a Porcine Oct-4 Promoter-driven EGFP Reporter System for Monitoring Pluripotency of Porcine Stem Cells". *Cellular Reprogramming* 13 (2) (duben): 93–98. doi:10.1089/cell.2010.0069.
- Huangfu, Danwei, René Maehr, Wenjun Guo, Astrid Eijkelenboom, Melinda Snitow, Alice E Chen, a Douglas A Melton. 2008. „Induction of Pluripotent Stem Cells by Defined Factors Is Greatly Improved by Small-molecule Compounds". *Nature Biotechnology* 26 (7) (červenec): 795–797. doi:10.1038/nbt1418.
- Huangfu, Danwei, Kenji Osafune, René Maehr, Wenjun Guo, Astrid Eijkelenboom, Shuibing Chen, Whitney Muhlestein, a Douglas A Melton. 2008. „Induction of Pluripotent Stem Cells from Primary Human Fibroblasts with Only Oct4 and Sox2". *Nature Biotechnology* 26 (11) (listopad): 1269–1275. doi:10.1038/nbt.1502.
- Hussein, Samer M, Nizar N Batada, Sanna Vuoristo, Reagan W Ching, Reija Autio, Elisa Närvä, Siemon Ng, et al. 2011. „Copy Number Variation and Selection During Reprogramming to Pluripotency". *Nature* 471 (7336) (březen 3): 58–62. doi:10.1038/nature09871.
- Hyslop, Louise A., Lyle Armstrong, Miodrag Stojkovic, a Majlinda Lako. 2005. „Human embryonic stem cells: biology and clinical implications". *Expert Reviews in Molecular Medicine* 7 (Human embryonic stem cells: biology and clinical implications 19): 1–21. doi:10.1017/S1462399405009804.
- Chakraborty, Syandan, Nicolas Christoforou, Ali Fattahi, Roland W Herzog, a Kam W Leong. 2013. „A Robust Strategy for Negative Selection of Cre-LoxP Recombination-Based Excision of Transgenes in Induced Pluripotent Stem Cells". *PloS One* 8 (5): e64342. doi:10.1371/journal.pone.0064342.
- Chambers, Ian, Jose Silva, Douglas Colby, Jennifer Nichols, Bianca Nijmeijer, Morag Robertson, Jan Vrana, Ken Jones, Lars Grotewold, a Austin Smith. 2007. „Nanog Safeguards Pluripotency and Mediates Germline Development". *Nature* 450 (7173) (prosinec 20): 1230–1234. doi:10.1038/nature06403.
- Chen, Xi, Han Xu, Ping Yuan, Fang Fang, Mikael Huss, Vinsensius B Vega, Eleanor Wong, et al. 2008. „Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells". *Cell* 133 (6) (červen 13): 1106–1117. doi:10.1016/j.cell.2008.04.043.
- Cheng, De, Yanjie Guo, Zhenzhen Li, Yajun Liu, Xing Gao, Yi Gao, Xiang Cheng, Junhe Hu, a Huayan Wang. 2012. „Porcine Induced Pluripotent Stem Cells Require LIF and Maintain Their Developmental Potential in Early Stage of Embryos". *PloS One* 7 (12): e51778. doi:10.1371/journal.pone.0051778.
- Chenoweth, Josh G, Ronald D G McKay, a Paul J Tesar. 2010. „Epiblast Stem Cells Contribute New Insight into Pluripotency and Gastrulation". *Development, Growth & Differentiation* 52 (3) (duben): 293–301. doi:10.1111/j.1440-169X.2010.01171.x.
- Churko, Jared M, Paul W Burridge, a Joseph C Wu. 2013. „Generation of Human iPSCs from Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Using Non-integrative Sendai Virus in Chemically Defined Conditions". *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1036: 81–88. doi:10.1007/978-1-62703-511-8\_7.



- Ichida, Justin K., Joel Blanchard, Kelvin Lam, Esther Y. Son, Julia E. Chung, Dieter Egli, Kyle M. Loh, et al. 2009. „A Small Molecule Inhibitor of Tgf- $\beta$  Signaling Replaces Sox2 in Reprogramming by Inducing Nanog". *Cell Stem Cell* 5 (5) (listopad 6): 491–503. doi:10.1016/j.stem.2009.09.012.
- Jacobsen, Jessie C, C Simon Bawden, Skye R Rudiger, Clive J McLaughlan, Suzanne J Reid, Henry J Waldvogel, Marcy E MacDonald, et al. 2010. „An Ovine Transgenic Huntington's Disease Model". *Human Molecular Genetics* 19 (10) (květen 15): 1873–1882. doi:10.1093/hmg/ddq063.
- James, Daylon, Ariel J Levine, Daniel Besser, a Ali Hemmati-Brivanlou. 2005. „TGF $\beta$ /activin/nodal Signaling Is Necessary for the Maintenance of Pluripotency in Human Embryonic Stem Cells". *Development (Cambridge, England)* 132 (6) (březen): 1273–1282. doi:10.1242/dev.01706.
- Jin, Zi-Bing, Satoshi Okamoto, Ping Xiang, a Masayo Takahashi. 2012. „Integration-free Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Retinitis Pigmentosa Patient for Disease Modeling". *Stem Cells Translational Medicine* 1 (6) (červen): 503–509. doi:10.5966/sctm.2012-0005.
- Juopperi, Tarja A, Woon Ryoung Kim, Cheng-Hsuan Chiang, Huimei Yu, Russell L Margolis, Christopher A Ross, Guo-li Ming, a Hongjun Song. 2012. „Astrocytes Generated from Patient Induced Pluripotent Stem Cells Recapitulate Features of Huntington's Disease Patient Cells". *Molecular Brain* 5: 17. doi:10.1186/1756-6606-5-17.
- Kaji, Keisuke, Katherine Norrby, Agnieszka Paca, Maria Mileikovsky, Paria Mohseni, a Knut Woltjen. 2009. „Virus-free Induction of Pluripotency and Subsequent Excision of Reprogramming Factors". *Nature* 458 (7239) (duben 9): 771–775. doi:10.1038/nature07864.
- Kaneko, Shin, a Shinya Yamanaka. 2013. „To Be Immunogenic, or Not to Be: That's the iPSC Question". *Cell Stem Cell* 12 (4) (duben 4): 385–386. doi:10.1016/j.stem.2013.03.008.
- Kawamura, Teruhisa, Jotaro Suzuki, Yunyuan V Wang, Sergio Menendez, Laura Batlle Morera, Angel Raya, Geoffrey M Wahl, a Juan Carlos Izpisua Belmonte. 2009. „Linking the P53 Tumour Suppressor Pathway to Somatic Cell Reprogramming". *Nature* 460 (7259) (srpen 27): 1140–1144. doi:10.1038/nature08311.
- Keefer, C L, D Pant, L Blomberg, a N C Talbot. 2007. „Challenges and Prospects for the Establishment of Embryonic Stem Cell Lines of Domesticated Ungulates". *Animal Reproduction Science* 98 (1-2) (březen): 147–168. doi:10.1016/j.anireprosci.2006.10.009.
- Kelley, Karen, a Shi-Lung Lin. 2012. „Induction of Somatic Cell Reprogramming Using the microRNA miR-302". *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 111: 83–107. doi:10.1016/B978-0-12-398459-3.00004-6.
- Kim, Jeong Beom, Boris Greber, Marcos J Araúzo-Bravo, Johann Meyer, Kook In Park, Holm Zaehres, a Hans R Schöler. 2009a. „Direct Reprogramming of Human Neural Stem Cells by OCT4". *Nature* 461 (7264) (říjen 1): 649–643. doi:10.1038/nature08436.
- . 2009b. „Direct Reprogramming of Human Neural Stem Cells by OCT4". *Nature* 461 (7264) (říjen 1): 649–643. doi:10.1038/nature08436.
- Kim, K, A Doi, B Wen, K Ng, R Zhao, P Cahan, J Kim, et al. 2010. „Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells". *Nature* 467 (7313) (září 16): 285–290. doi:10.1038/nature09342.
- Kimura, Tohru, a Toru Nakano. 2011. „Induction of Pluripotency in Primordial Germ Cells". *Histology and Histopathology* 26 (5) (květen): 643–650.
- Kimura, Tohru, Akira Suzuki, Yukiko Fujita, Kentaro Yomogida, Hilda Lomeli, Noriko Asada, Megumi Ikeuchi, Andras Nagy, Tak W Mak, a Toru Nakano. 2003. „Conditional Loss of PTEN Leads to Testicular Teratoma and Enhances Embryonic Germ Cell Production". *Development (Cambridge, England)* 130 (8) (duben): 1691–1700.

- Kimura, Tohru, Maya Tomooka, Noriko Yamano, Kazushige Murayama, Shogo Matoba, Hiroki Umehara, Yoshiakira Kanai, a Toru Nakano. 2008. „AKT Signaling Promotes Derivation of Embryonic Germ Cells from Primordial Germ Cells". *Development (Cambridge, England)* 135 (5) (březen): 869–879. doi:10.1242/dev.013474.
- Kiyonari, Hiroshi, Mari Kaneko, Shin-ichi Abe, a Shinichi Aizawa. 2010. „Three Inhibitors of FGF Receptor, ERK, and GSK3 Establishes Germline-competent Embryonic Stem Cells of C57BL/6N Mouse Strain with High Efficiency and Stability". *Genesis (New York, N.Y.: 2000)* 48 (5) (květen): 317–327. doi:10.1002/dvg.20614.
- Kopp, Janel L, Briana D Ormsbee, Michelle Desler, a Angie Rizzino. 2008. „Small Increases in the Level of Sox2 Trigger the Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells". *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 26 (4) (duben): 903–911. doi:10.1634/stemcells.2007-0951.
- Kreitzer, Anatol C., a Robert C. Malenka. 2008. „Striatal plasticity and basal ganglia circuit function". *Neuron* 60 (4) (listopad 26): 543–554. doi:10.1016/j.neuron.2008.11.005.
- Kues, Wilfried A, Doris Herrmann, Brigitte Barg-Kues, Srividameena Haridoss, Monika Nowak-Imialek, Thomas Buchholz, Miriam Streeck, et al. 2013. „Derivation and Characterization of Sleeping Beauty Transposon-mediated Porcine Induced Pluripotent Stem Cells". *Stem Cells and Development* 22 (1) (leden 1): 124–135. doi:10.1089/scd.2012.0382.
- Kuijk, Ewart W, Susana M Chuva de Sousa Lopes, Niels Geijsen, Nick Macklon, a Bernard A J Roelen. 2011. „The Different Shades of Mammalian Pluripotent Stem Cells". *Human Reproduction Update* 17 (2) (duben): 254–271. doi:10.1093/humupd/dmq035.
- Kumar De, Arun, Dhruva Malakar, Yogesh S Akshey, Manoj Kumar Jena, a Rahul Dutta. 2011. „Isolation and Characterization of Embryonic Stem Cell-like Cells from in Vitro Produced Goat (*Capra Hircus*) Embryos". *Animal Biotechnology* 22 (4) (říjen): 181–196. doi:10.1080/10495398.2011.622189.
- Kunath, Tilo, Marc K Saba-El-Leil, Marwa Almousailleakh, Jason Wray, Sylvain Meloche, a Austin Smith. 2007. „FGF Stimulation of the Erk1/2 Signalling Cascade Triggers Transition of Pluripotent Embryonic Stem Cells from Self-renewal to Lineage Commitment". *Development (Cambridge, England)* 134 (16) (srpen): 2895–2902. doi:10.1242/dev.02880.
- Kuo, Chih-Hao, Jia Han Deng, Qinggao Deng, a Shao-Yao Ying. 2012. „A Novel Role of miR-302/367 in Reprogramming". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 417 (1) (leden 6): 11–16. doi:10.1016/j.bbrc.2011.11.058.
- Kurome, Mayuko, Ludwig Geistlinger, Barbara Kessler, Valeri Zakhartchenko, Nikolai Klymiuk, Annegret Wuensch, Anne Richter, et al. 2013. „Factors Influencing the Efficiency of Generating Genetically Engineered Pigs by Nuclear Transfer: Multifactorial Analysis of a Large Data Set". *BMC Biotechnology* 13: 43. doi:10.1186/1472-6750-13-43.
- Lee, Man Ryul, Nutan Prasain, Hee-Don Chae, Young-June Kim, Charlie Mantel, Mervin C Yoder, a Hal E Broxmeyer. 2012. „Epigenetic Regulation of NANOG by miR-302 cluster-MBD2 Completes Induced Pluripotent Stem Cell Reprogramming". *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 31 (4) (duben): 666–681. doi:10.1002/stem.1302.
- Lee, Min Gyu, Christopher Wynder, Dawn M Schmidt, Dewey G McCafferty, a Ramin Shiekhata. 2006. „Histone H3 Lysine 4 Demethylation Is a Target of Nonselective Antidepressive Medications". *Chemistry & Biology* 13 (6) (červen): 563–567. doi:10.1016/j.chembiol.2006.05.004.
- Li, Meng Amy, Daniel J Turner, Zemin Ning, Kosuke Yusa, Qi Liang, Sabine Eckert, Lena Rad, Tomas W Fitzgerald, Nancy L Craig, a Allan Bradley. 2011b. „Mobilization of Giant piggyBac Transposons in the Mouse Genome". *Nucleic Acids Research* 39 (22) (prosinec): e148. doi:10.1093/nar/gkr764.
- Li, Ming, Dong Zhang, Yi Hou, Lihong Jiao, Xing Zheng, a Wei-Hua Wang. 2003. „Isolation and Culture of Embryonic Stem Cells from Porcine Blastocysts".

- Molecular Reproduction and Development* 65 (4) (srpen): 429–434. doi:10.1002/mrd.10301.
- Li, Ronghui, Jialiang Liang, Su Ni, Ting Zhou, Xiaobing Qing, Huapeng Li, Wenzhi He, et al. 2010a. „A Mesenchymal-to-epithelial Transition Initiates and Is Required for the Nuclear Reprogramming of Mouse Fibroblasts". *Cell Stem Cell* 7 (1) (červenec 2): 51–63. doi:10.1016/j.stem.2010.04.014.
- Li, Wenlin, a Sheng Ding. 2010b. „Small molecules that modulate embryonic stem cell fate and somatic cell reprogramming". *Trends in Pharmacological Sciences* 31 (1) (leden): 36–45. doi:10.1016/j.tips.2009.10.002.
- Li, Wenlin, Wei Wei, Saiyong Zhu, Jinliang Zhu, Yan Shi, Tongxiang Lin, Ergeng Hao, Alberto Hayek, Hongkui Deng, a Sheng Ding. 2009a. „Generation of Rat and Human Induced Pluripotent Stem Cells by Combining Genetic Reprogramming and Chemical Inhibitors". *Cell Stem Cell* 4 (1) (leden 9): 16–19. doi:10.1016/j.stem.2008.11.014.
- Li, Wenlin, HongYan Zhou, Ramzey Abujarour, Saiyong Zhu, Jin Young Joo, Tongxiang Lin, Ergeng Hao, Hans R Schöler, Alberto Hayek, a Sheng Ding. 2009b. „Generation of Human-induced Pluripotent Stem Cells in the Absence of Exogenous Sox2". *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 27 (12) (prosinec): 2992–3000. doi:10.1002/stem.240.
- Li, Xiao-Jiang, a Shihua Li. 2012. „Influence of Species Differences on the Neuropathology of Transgenic Huntington's Disease Animal Models". *Journal of Genetics and Genomics = Yi Chuan Xue Bao* 39 (6) (červen 20): 239–245. doi:10.1016/j.jgg.2012.05.002.
- Li, Yanqin, Qiang Zhang, Xiaolei Yin, Weifeng Yang, Yuanyuan Du, Pingping Hou, Jian Ge, et al. 2011c. „Generation of iPSCs from Mouse Fibroblasts with a Single Gene, Oct4, and Small Molecules". *Cell Research* 21 (1) (leden): 196–204. doi:10.1038/cr.2010.142.
- Li, Zhonghan, Chao-Shun Yang, Katsuhiko Nakashima, a Tariq M Rana. 2011a. „Small RNA-mediated Regulation of iPS Cell Generation". *The EMBO Journal* 30 (5) (březen 2): 823–834. doi:10.1038/emboj.2011.2.
- Liao, Baojian, Xichen Bao, Longqi Liu, Shipeng Feng, Athanasios Zovoilis, Wenbo Liu, Yanting Xue, et al. 2011. „MicroRNA Cluster 302-367 Enhances Somatic Cell Reprogramming by Accelerating a Mesenchymal-to-epithelial Transition". *The Journal of Biological Chemistry* 286 (19) (květen 13): 17359–17364. doi:10.1074/jbc.C111.235960.
- Lin, Shi-Lung, Donald C Chang, Shao-Yao Ying, Davey Leu, a David T S Wu. 2010. „MicroRNA miR-302 Inhibits the Tumorigenicity of Human Pluripotent Stem Cells by Coordinate Suppression of the CDK2 and CDK4/6 Cell Cycle Pathways". *Cancer Research* 70 (22) (listopad 15): 9473–9482. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2746.
- Lin, Shi-Lung, Donald C. Chang, Chun-Hung Lin, Shao-Yao Ying, Davey Leu, a David T. S. Wu. 2011. „Regulation of Somatic Cell Reprogramming through Inducible Mir-302 Expression". *Nucleic Acids Research* 39 (3) (leden 2): 1054–1065. doi:10.1093/nar/gkq850.
- Loh, Yuin-Han, Jia-Hui Ng, a Huck-Hui Ng. 2008. „Molecular Framework Underlying Pluripotency". *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 7 (7) (duben 1): 885–891.
- Loh, Yuin-Han, Qiang Wu, Joon-Lin Chew, Vinsensius B Vega, Weiwei Zhang, Xi Chen, Guillaume Bourque, et al. 2006. „The Oct4 and Nanog Transcription Network Regulates Pluripotency in Mouse Embryonic Stem Cells". *Nature Genetics* 38 (4) (duben): 431–440. doi:10.1038/ng1760.
- Loh, Yuin-Han, Jimmy Chen Yang, Alejandro De Los Angeles, Chunguang Guo, Anne Cherry, Derrick J Rossi, In-Hyun Park, a George Q Daley. 2012. „Excision of a Viral Reprogramming Cassette by Delivery of Synthetic Cre mRNA". *Current Protocols in Stem Cell Biology* Chapter 4: Unit4A.5. doi:10.1002/9780470151808.sc04a05s21.

- Madonna, Rosalinda. 2012. „Human-induced Pluripotent Stem Cells: In Quest of Clinical Applications". *Molecular Biotechnology* 52 (2) (říjen): 193–203. doi:10.1007/s12033-012-9504-0.
- Mah, Nancy, Ying Wang, Mei-Chih Liao, Alessandro Prigione, Justyna Jozefczuk, Björn Lichtner, Katharina Wolfrum, et al. 2011. „Molecular Insights into Reprogramming-initiation Events Mediated by the OSKM Gene Regulatory Network". *PloS One* 6 (8): e24351. doi:10.1371/journal.pone.0024351.
- Maherali, Nimet, a Konrad Hochedlinger. 2009. „Tgf $\beta$  signal inhibition cooperates in the induction of iPSCs and replaces Sox2 and cMyc". *Current biology*: CB 19 (20) (listopad 3): 1718–1723. doi:10.1016/j.cub.2009.08.025.
- Mandal, Pankaj K, a Derrick J Rossi. 2013. „Reprogramming Human Fibroblasts to Pluripotency Using Modified mRNA". *Nature Protocols* 8 (3) (březen): 568–582. doi:10.1038/nprot.nprot.2013.019.
- Mantalenakis, Serge J., a Melvin M. Ketchel. 1966. „Frequency and Extent of Delayed Implantation in Lactating Rats and Mice". *Journal of Reproduction and Fertility* 12 (2) (leden 10): 391–394. doi:10.1530/jrf.0.0120391.
- Maraghechi, Pouneh, László Hiripi, Gábor Tóth, Babett Bontovics, Zsuzsanna Bösze, a Elen Gócza. 2013. „Discovery of Pluripotency-associated microRNAs in Rabbit Preimplantation Embryos and Embryonic Stem-like Cells". *Reproduction (Cambridge, England)* 145 (4) (duben 1): 421–437. doi:10.1530/REP-12-0259.
- Marson, Alexander, Ruth Foreman, Brett Chevalier, Steve Bilodeau, Michael Kahn, Richard A. Young, a Rudolf Jaenisch. 2008. „Wnt signaling promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency". *Cell stem cell* 3 (2) (srpen 7): 132–135. doi:10.1016/j.stem.2008.06.019.
- Martin, G. R. 1981. „Isolation of a Pluripotent Cell Line from Early Mouse Embryos Cultured in Medium Conditioned by Teratocarcinoma Stem Cells". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 78 (12) (leden 12): 7634–7638.
- Massagué, Joan, a Qiaoran Xi. 2012. „TGF- $\beta$  Control of Stem Cell Differentiation Genes". *FEBS Letters* 586 (14) (červenec 4): 1953–1958. doi:10.1016/j.febslet.2012.03.023.
- Matsuda, T, T Nakamura, K Nakao, T Arai, M Katsuki, T Heike, a T Yokota. 1999. „STAT3 Activation Is Sufficient to Maintain an Undifferentiated State of Mouse Embryonic Stem Cells". *The EMBO Journal* 18 (15) (srpen 2): 4261–4269. doi:10.1093/emboj/18.15.4261.
- Matsui, Y, K Zsebo, a B L Hogan. 1992. „Derivation of Pluripotential Embryonic Stem Cells from Murine Primordial Germ Cells in Culture". *Cell* 70 (5) (září 4): 841–847.
- Matsunari, Hitomi, a Hiroshi Nagashima. 2009. „Application of Genetically Modified and Cloned Pigs in Translational Research". *The Journal of Reproduction and Development* 55 (3) (červen): 225–230.
- Matsuyama, N, S Hadano, K Onoe, H Osuga, J Showguchi-Miyata, Y Gondo, a J E Ikeda. 2000. „Identification and characterization of the miniature pig Huntington's disease gene homolog: evidence for conservation and polymorphism in the CAG triplet repeat". *Genomics* 69 (1) (říjen 1): 72–85. doi:10.1006/geno.2000.6317.
- McGrath, J, a D Solter. 1984. „Inability of Mouse Blastomere Nuclei Transferred to Enucleated Zygotes to Support Development in Vitro". *Science (New York, N.Y.)* 226 (4680) (prosinec 14): 1317–1319.
- Meissner, Alexander, Marius Wernig, a Rudolf Jaenisch. 2007. „Direct Reprogramming of Genetically Unmodified Fibroblasts into Pluripotent Stem Cells". *Nature Biotechnology* 25 (10) (říjen): 1177–1181. doi:10.1038/nbt1335.
- Meng, Fengxi, Siye Chen, Qinglong Miao, Kechun Zhou, Qicheng Lao, Xiaohui Zhang, Wenyi Guo, a Jianwei Jiao. 2012. „Induction of Fibroblasts to Neurons through Adenoviral Gene Delivery". *Cell Research* 22 (2) (únor): 436–440. doi:10.1038/cr.2011.185.
- Merling, Randall K, Colin L Sweeney, Uimook Choi, Suk See De Ravin, Timothy G Myers, Francisco Otaizo-Carrasquero, Jason Pan, et al. 2013. „Transgene-free iPSCs

- Generated from Small Volume Peripheral Blood Nonmobilized CD34+ Cells". *Blood* 121 (14) (duben 4): e98–107. doi:10.1182/blood-2012-03-420273.
- Mitsui, Kaoru, Yoshimi Tokuzawa, Hiroaki Itoh, Kohichi Segawa, Mirei Murakami, Kazutoshi Takahashi, Masayoshi Maruyama, Mitsuyo Maeda, a Shinya Yamanaka. 2003. „The Homeoprotein Nanog Is Required for Maintenance of Pluripotency in Mouse Epiblast and ES Cells". *Cell* 113 (5) (květen 30): 631–642.
- Miyoshi, Norikatsu, Hideshi Ishii, Hiroaki Nagano, Naotsugu Haraguchi, Dyah Laksmi Dewi, Yoshihiro Kano, Shinpei Nishikawa, et al. 2011. „Reprogramming of Mouse and Human Cells to Pluripotency Using Mature microRNAs". *Cell Stem Cell* 8 (6) (červen 3): 633–638. doi:10.1016/j.stem.2011.05.001.
- Mochiduki, Yuji, a Keisuke Okita. 2012. „Methods for iPS Cell Generation for Basic Research and Clinical Applications". *Biotechnology Journal* 7 (6) (červen): 789–797. doi:10.1002/biot.201100356.
- Montserrat, Nùria, Elena Garreta Bahima, Laura Batlle, Sophia Häfner, Alexandre Miguel Cavaco Rodrigues, Federico González, a Juan Carlos Izpisua Belmonte. 2011. „Generation of Pig iPS Cells: a Model for Cell Therapy". *Journal of Cardiovascular Translational Research* 4 (2) (duben): 121–130. doi:10.1007/s12265-010-9233-3.
- Morrissey, E E, Z Tang, K Sigrist, M M Lu, F Jiang, H S Ip, a M S Parmacek. 1998. „GATA6 Regulates HNF4 and Is Required for Differentiation of Visceral Endoderm in the Mouse Embryo". *Genes & Development* 12 (22) (listopad 15): 3579–3590.
- Muenthaisong, Suchitra, Olga Ujhelly, Zsuzsanna Polgar, Eszter Varga, Zoltan Ivics, Melinda K Pirity, a Andras Dinnyes. 2012. „Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells from Different Genetic Backgrounds Using Sleeping Beauty Transposon Mediated Gene Transfer". *Experimental Cell Research* 318 (19) (listopad 15): 2482–2489. doi:10.1016/j.yexcr.2012.07.014.
- Müller, Lars U W, Michael D Milsom, Chad E Harris, Rutesh Vyas, Kristina M Brumme, Kalindi Parmar, Lisa A Moreau, et al. 2012. „Overcoming Reprogramming Resistance of Fanconi Anemia Cells". *Blood* 119 (23) (červen 7): 5449–5457. doi:10.1182/blood-2012-02-408674.
- Mullick, Alaka, Yan Xu, René Warren, Maria Koutroumanis, Claire Guilbault, Sophie Broussau, Félix Malenfant, et al. 2006. „The Cumate Gene-switch: a System for Regulated Expression in Mammalian Cells". *BMC Biotechnology* 6: 43. doi:10.1186/1472-6750-6-43.
- Muzaffar, Musharifa, Naresh L Selokar, Karn P Singh, Mohammad Zandi, Manoj K Singh, Riaz A Shah, Manmohan S Chauhan, Suresh K Singla, Prabhat Palta, a Radheysham Manik. 2012. „Equivalency of Buffalo (Bubalus Bubalis) Embryonic Stem Cells Derived from Fertilized, Parthenogenetic, and Hand-made Cloned Embryos". *Cellular Reprogramming* 14 (3) (červen): 267–279. doi:10.1089/cell.2011.0090.
- Nagy, A, E Góczy, E M Diaz, V R Prideaux, E Iványi, M Markkula, a J Rossant. 1990. „Embryonic Stem Cells Alone Are Able to Support Fetal Development in the Mouse". *Development (Cambridge, England)* 110 (3) (listopad): 815–821.
- Navarro, Pablo, Nicola Festuccia, Douglas Colby, Alessia Gagliardi, Nicholas P Mullin, Wensheng Zhang, Violetta Karwacki-Neisius, et al. 2012. „OCT4/SOX2-independent Nanog Autorepression Modulates Heterogeneous Nanog Gene Expression in Mouse ES Cells". *The EMBO Journal* 31 (24) (prosinec 12): 4547–4562. doi:10.1038/emboj.2012.321.
- Nichols, J, I Chambers, T Taga, a A Smith. 2001. „Physiological Rationale for Responsiveness of Mouse Embryonic Stem Cells to Gp130 Cytokines". *Development (Cambridge, England)* 128 (12) (červen): 2333–2339.
- Nichols, Jennifer, a Austin Smith. 2009. „Naive and Primed Pluripotent States". *Cell Stem Cell* 4 (6) (červen 5): 487–492. doi:10.1016/j.stem.2009.05.015.
- Niwa, H, T Burdon, I Chambers, a A Smith. 1998. „Self-renewal of Pluripotent Embryonic Stem Cells Is Mediated via Activation of STAT3". *Genes & Development* 12 (13) (červenec 1): 2048–2060.

- Niwa, H, J Miyazaki, a A G Smith. 2000. „Quantitative Expression of Oct-3/4 Defines Differentiation, Dedifferentiation or Self-renewal of ES Cells". *Nature Genetics* 24 (4) (duben): 372–376. doi:10.1038/74199.
- Niwa, Hitoshi, Kazuya Ogawa, Daisuke Shimosato, a Kenjiro Adachi. 2009. „A Parallel Circuit of LIF Signalling Pathways Maintains Pluripotency of Mouse ES Cells". *Nature* 460 (7251) (červenec 2): 118–122. doi:10.1038/nature08113.
- Niwa, Hitoshi, Yayoi Toyooka, Daisuke Shimosato, Dan Strumpf, Kadue Takahashi, Rika Yagi, a Janet Rossant. 2005. „Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation". *Cell* 123 (5) (prosinec 2): 917–929. doi:10.1016/j.cell.2005.08.040.
- Nowak-Imialek, Monika, Wilfried A Kues, Bjoern Petersen, Andrea Lucas-Hahn, Doris Herrmann, Srividyaameena Haridoss, Marianne Oropeza, et al. 2011. „Oct4-enhanced Green Fluorescent Protein Transgenic Pigs: a New Large Animal Model for Reprogramming Studies". *Stem Cells and Development* 20 (9) (září): 1563–1575. doi:10.1089/scd.2010.0399.
- Okita, Keisuke, Tomoko Ichisaka, a Shinya Yamanaka. 2007. „Generation of Germline-competent Induced Pluripotent Stem Cells". *Nature* 448 (7151) (červenec 19): 313–317. doi:10.1038/nature05934.
- Onder, Tamer T, a George Q Daley. 2012. „New Lessons Learned from Disease Modeling with Induced Pluripotent Stem Cells". *Current Opinion in Genetics & Development* 22 (5) (říjen): 500–508. doi:10.1016/j.gde.2012.05.005.
- Pant, Disha, a Carol L Keefer. 2009. „Expression of Pluripotency-related Genes During Bovine Inner Cell Mass Explant Culture". *Cloning and Stem Cells* 11 (3) (září): 355–365. doi:10.1089/clo.2008.0078.
- Park, Jin-Kyu, Hye-Sun Kim, Kyung-Jun Uh, Kwang-Hwan Choi, Hyeong-Min Kim, Taeheon Lee, Byung-Chul Yang, et al. 2013. „Primed Pluripotent Cell Lines Derived from Various Embryonic Origins and Somatic Cells in Pig". *PloS One* 8 (1): e52481. doi:10.1371/journal.pone.0052481.
- Pitman, M, B Emery, M Binder, S Wang, H Butzkueven, a T J Kilpatrick. 2004. „LIF Receptor Signaling Modulates Neural Stem Cell Renewal". *Molecular and Cellular Neurosciences* 27 (3) (listopad): 255–266. doi:10.1016/j.mcn.2004.07.004.
- Polo, Jose M, a Konrad Hochedlinger. 2010. „When Fibroblasts MET iPSCs". *Cell Stem Cell* 7 (1) (červenec 2): 5–6. doi:10.1016/j.stem.2010.05.018.
- Polo, Jose M, Susanna Liu, Maria Eugenia Figueroa, Warakorn Kulalert, Sarah Eminli, Kah Yong Tan, Effie Apostolou, et al. 2010. „Cell Type of Origin Influences the Molecular and Functional Properties of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells". *Nature Biotechnology* 28 (8) (srpen): 848–855. doi:10.1038/nbt.1667.
- Prigione, Alessandro, Beatrix Fauler, Rudi Lurz, Hans Lehrach, a James Adjaye. 2010. „The Senescence-related Mitochondrial/oxidative Stress Pathway Is Repressed in Human Induced Pluripotent Stem Cells". *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 28 (4) (duben): 721–733. doi:10.1002/stem.404.
- Prigione, Alessandro, Amir M Hossini, Björn Lichtner, Akdes Serin, Beatrix Fauler, Matthias Megges, Rudi Lurz, et al. 2011. „Mitochondrial-associated Cell Death Mechanisms Are Reset to an Embryonic-like State in Aged Donor-derived iPS Cells Harboring Chromosomal Aberrations". *PloS One* 6 (11): e27352. doi:10.1371/journal.pone.0027352.
- Renfree, M B, a G Shaw. 2000. „Diapause". *Annual Review of Physiology* 62: 353–375. doi:10.1146/annurev.physiol.62.1.353.
- Resnick, J L, L S Bixler, L Cheng, a P J Donovan. 1992. „Long-term Proliferation of Mouse Primordial Germ Cells in Culture". *Nature* 359 (6395) (říjen 8): 550–551. doi:10.1038/359550a0.
- Ritch, James J, Antonio Valencia, Jonathan Alexander, Ellen Sapp, Leah Gatune, Gavin R Sangrey, Saurabh Sinha, et al. 2012. „Multiple Phenotypes in Huntington Disease Mouse Neural Stem Cells". *Molecular and Cellular Neurosciences* 50 (1) (květen): 70–81. doi:10.1016/j.mcn.2012.03.011.

- Rodda, David J, Joon-Lin Chew, Leng-Hiong Lim, Yui-Han Loh, Bei Wang, Huck-Hui Ng, a Paul Robson. 2005. „Transcriptional Regulation of Nanog by OCT4 and SOX2". *The Journal of Biological Chemistry* 280 (26) (červenec 1): 24731–24737. doi:10.1074/jbc.M502573200.
- Rodriguez, Aida, Cinzia Allegrucci, a Ramiro Alberio. 2012. „Modulation of Pluripotency in the Porcine Embryo and iPS Cells". *PLoS ONE* 7 (11) (listopad 8). doi:10.1371/journal.pone.0049079.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3493503/>.
- Rosa, Alessandro, Francesca M. Spagnoli, a Ali H. Brivanlou. 2009. „The miR-430/427/302 Family Controls Mesendodermal Fate Specification via Species-Specific Target Selection". *Developmental Cell* 16 (4) (duben 21): 517–527. doi:10.1016/j.devcel.2009.02.007.
- Ross, Christopher A, a Sarah J Tabrizi. 2011. „Huntington's Disease: From Molecular Pathogenesis to Clinical Treatment". *Lancet Neurology* 10 (1) (leden): 83–98. doi:10.1016/S1474-4422(10)70245-3.
- Rossant, Janet, Elizabeth Merentes-Diaz, Elen Gocza, Eszter Ivanyi, a Andras Nagy. 1993. „Developmental Potential of Mouse Embryonic Stem Cells". In *Preimplantation Embryo Development*, editoval Barry D. Bavister, 157–165. Sero Symposium, USA Norwell, Massachusetts. Springer New York.  
[http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4613-9317-7\\_12](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4613-9317-7_12).
- Samavarchi-Tehrani, Payman, Azadeh Golipour, Laurent David, Hoon-Ki Sung, Tobias A Beyer, Alessandro Datti, Knut Woltjen, Andras Nagy, a Jeffrey L Wrana. 2010. „Functional Genomics Reveals a BMP-driven Mesenchymal-to-epithelial Transition in the Initiation of Somatic Cell Reprogramming". *Cell Stem Cell* 7 (1) (červenec 2): 64–77. doi:10.1016/j.stem.2010.04.015.
- Sato, Noboru, Laurent Meijer, Leandros Skaltsounis, Paul Greengard, a Ali H Brivanlou. 2004. „Maintenance of Pluripotency in Human and Mouse Embryonic Stem Cells through Activation of Wnt Signaling by a Pharmacological GSK-3-specific Inhibitor". *Nature Medicine* 10 (1) (leden): 55–63. doi:10.1038/nm979.
- Seamon, K. B., W. Padgett, a J. W. Daly. 1981. „Forskolin: Unique Diterpene Activator of Adenylate Cyclase in Membranes and in Intact Cells". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 78 (6) (leden 6): 3363–3367.
- Shao, Lijian, Wei Feng, Yan Sun, Hao Bai, Jun Liu, Caroline Currie, Jaejung Kim, et al. 2009. „Generation of iPS Cells Using Defined Factors Linked via the Self-cleaving 2A Sequences in a Single Open Reading Frame". *Cell Research* 19 (3) (březen): 296–306. doi:10.1038/cr.2009.20.
- Shi, Yan, Caroline Despons, Jeong Tae Do, Heung Sik Hahm, Hans R Schöler, a Sheng Ding. 2008. „Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic Fibroblasts by Oct4 and Klf4 with Small-molecule Compounds". *Cell Stem Cell* 3 (5) (listopad 6): 568–574. doi:10.1016/j.stem.2008.10.004.
- Shi, Yan, Jeong Tae Do, Caroline Despons, Heung Sik Hahm, Hans R Schöler, a Sheng Ding. 2008. „A Combined Chemical and Genetic Approach for the Generation of Induced Pluripotent Stem Cells". *Cell Stem Cell* 2 (6) (červen 5): 525–528. doi:10.1016/j.stem.2008.05.011.
- Silva, Jose, Ornella Barrandon, Jennifer Nichols, Jitsutaro Kawaguchi, Thorold W Theunissen, a Austin Smith. 2008. „Promotion of Reprogramming to Ground State Pluripotency by Signal Inhibition". *PLoS Biology* 6 (10) (říjen 21): e253. doi:10.1371/journal.pbio.0060253.
- Silva, Susana S, Rebecca K Rowntree, Shila Mekhoubad, a Jeannie T Lee. 2008. „X-chromosome Inactivation and Epigenetic Fluidity in Human Embryonic Stem Cells". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (12) (březen 25): 4820–4825. doi:10.1073/pnas.0712136105.
- Smith, A G. 2001. „Embryo-derived Stem Cells: Of Mice and Men". *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 17: 435–462. doi:10.1146/annurev.cellbio.17.1.435.

- Stadtfield, Matthias, Masaki Nagaya, Jochen Utikal, Gordon Weir, a Konrad Hochedlinger. 2008. „Induced Pluripotent Stem Cells Generated Without Viral Integration". *Science (New York, N.Y.)* 322 (5903) (listopad 7): 945–949. doi:10.1126/science.1162494.
- Subramanyam, Deepa, Samy Lamouille, Robert L Judson, Jason Y Liu, Nathan Bucay, Rik Derynck, a Robert Blelloch. 2011. „Multiple Targets of miR-302 and miR-372 Promote Reprogramming of Human Fibroblasts to Induced Pluripotent Stem Cells". *Nature Biotechnology* 29 (5) (květen): 443–448. doi:10.1038/nbt.1862.
- Suh, Mi-Ra, Yoontae Lee, Jung Yeon Kim, Soo-Kyoung Kim, Sung-Hwan Moon, Ji Yeon Lee, Kwang-Yul Cha, et al. 2004. „Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs". *Developmental Biology* 270 (2): 488–498. doi:10.1016/j.ydbio.2004.02.019.
- Suwinska, Aneta, a Maria A Ciemerych. 2011. „Factors Regulating Pluripotency and Differentiation in Early Mammalian Embryos and Embryo-derived Stem Cells". *Vitamins and Hormones* 87: 1–37. doi:10.1016/B978-0-12-386015-6.00022-6.
- Szymczak, Andrea L, Creg J Workman, Yao Wang, Kate M Vignali, Smaroula Dilioglou, Elio F Vanin, a Dario A A Vignali. 2004. „Correction of Multi-gene Deficiency in Vivo Using a Single ‚Self-cleaving‘ 2A Peptide-based Retroviral Vector". *Nature Biotechnology* 22 (5) (květen): 589–594. doi:10.1038/nbt957.
- Takahashi, Kazutoshi, a Shinya Yamanaka. 2006. „Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors". *Cell* 126 (4) (srpen 25): 663–676. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024.
- Tarkowski, Andrzej K., a Joanna Wróblewska. 1967. „Development of Blastomeres of Mouse Eggs Isolated at the 4- and 8-cell Stage". *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 18 (1) (leden 8): 155–180.
- Telugu, Bhanu Prakash V L, Toshihiko Ezashi, a R Michael Roberts. 2010. „Porcine Induced Pluripotent Stem Cells Analogous to Naïve and Primed Embryonic Stem Cells of the Mouse". *The International Journal of Developmental Biology* 54 (11-12): 1703–1711. doi:10.1387/ijdb.103200bt.
- Telugu, Bhanu Prakash V L, Toshihiko Ezashi, Sunilima Sinha, Andrei P Alexenko, Lee Spate, Randall S Prather, a R Michael Roberts. 2011. „Leukemia Inhibitory Factor (LIF)-dependent, Pluripotent Stem Cells Established from Inner Cell Mass of Porcine Embryos". *The Journal of Biological Chemistry* 286 (33) (srpen 19): 28948–28953. doi:10.1074/jbc.M111.229468.
- Tesar, Paul J, Josh G Chenoweth, Frances A Brook, Timothy J Davies, Edward P Evans, David L Mack, Richard L Gardner, a Ronald D G McKay. 2007. „New Cell Lines from Mouse Epiblast Share Defining Features with Human Embryonic Stem Cells". *Nature* 448 (7150) (červenec 12): 196–199. doi:10.1038/nature05972.
- Thanasegaran, Suganya, Zhao Cheng, Sachiko Ito, Naomi Nishio, a Ken-Ichi Isobe. 2013. „No Immunogenicity of IPS Cells in Syngeneic Host Studied by In Vivo Injection and 3D Scaffold Experiments". *BioMed Research International* 2013: 378207. doi:10.1155/2013/378207.
- Thomas, K R, a M R Capecchi. 1987. „Site-directed Mutagenesis by Gene Targeting in Mouse Embryo-derived Stem Cells". *Cell* 51 (3) (listopad 6): 503–512.
- Thomson, J A, J Kalishman, T G Golos, M Durning, C P Harris, R A Becker, a J P Hearn. 1995. „Isolation of a Primate Embryonic Stem Cell Line". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (17) (srpen 15): 7844–7848.
- Thomson, J A, J Kalishman, T G Golos, M Durning, C P Harris, a J P Hearn. 1996. „Pluripotent Cell Lines Derived from Common Marmoset (*Callithrix jacchus*) Blastocysts". *Biology of Reproduction* 55 (2) (srpen): 254–259.
- Thomson, James A., Joseph Itskovitz-Eldor, Sander S. Shapiro, Michelle A. Waknitz, Jennifer J. Swiergiel, Vivienne S. Marshall, a Jeffrey M. Jones. 1998. „Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts". *Science* 282 (5391) (červen 11): 1145–1147. doi:10.1126/science.282.5391.1145.



- Tojo, Masayoshi, Yoshio Hamashima, Aki Hanyu, Tetsuya Kajimoto, Masao Saitoh, Kohei Miyazono, Manabu Node, a Takeshi Imamura. 2005. „The ALK-5 Inhibitor A-83-01 Inhibits Smad Signaling and Epithelial-to-mesenchymal Transition by Transforming Growth Factor-beta". *Cancer Science* 96 (11) (listopad): 791–800. doi:10.1111/j.1349-7006.2005.00103.x.
- Toyooka, Yayoi, Daisuke Shimosato, Kazuhiro Murakami, Kadue Takahashi, a Hitoshi Niwa. 2008. „Identification and Characterization of Subpopulations in Undifferentiated ES Cell Culture". *Development (Cambridge, England)* 135 (5) (březen): 909–918. doi:10.1242/dev.017400.
- Tsukiyama, Tomoyuki, Ryota Asano, Takamasa Kawaguchi, Narae Kim, Masayasu Yamada, Naojiro Minami, Yasuhide Ohinata, a Hiroshi Imai. 2011. „Simple and Efficient Method for Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Using piggyBac Transposition of Doxycycline-inducible Factors and an EOS Reporter System". *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 16 (7) (červenec): 815–825. doi:10.1111/j.1365-2443.2011.01528.x.
- Utikal, Jochen, Jose M Polo, Matthias Stadtfeld, Nimet Maherali, Warakorn Kulalert, Ryan M Walsh, Adam Khalil, James G Rheinwald, a Konrad Hochedlinger. 2009. „Immortalization Eliminates a Roadblock During Cellular Reprogramming into iPS Cells". *Nature* 460 (7259) (srpen 27): 1145–1148. doi:10.1038/nature08285.
- Vackova, Irena, Andrea Ungrova, a Federica Lopes. 2007. „Putative Embryonic Stem Cell Lines from Pig Embryos". *The Journal of Reproduction and Development* 53 (6) (prosinec): 1137–1149.
- Van de Velde, Hilde, Greet Cauffman, Herman Tournaye, Paul Devroey, a Inge Liebaers. 2008. „The Four Blastomeres of a 4-cell Stage Human Embryo Are Able to Develop Individually into Blastocysts with Inner Cell Mass and Trophectoderm". *Human Reproduction (Oxford, England)* 23 (8) (srpen): 1742–1747. doi:10.1093/humrep/den190.
- Vargas, Antonio P, Francisco J Carod-Artal, Denise Bomfim, Carolina Vázquez-Cabrera, a Carmela Dantas-Barbosa. 2003. „Unusual Early-onset Huntingtons Disease". *Journal of Child Neurology* 18 (6) (červen): 429–432.
- Vassiliev, Ivan, Svetlana Vassilieva, Kam P Truong, Luke F S Beebe, Stephen M McIlpatrick, Sharon J Harrison, a Mark B Nottle. 2011. „Isolation and in Vitro Characterization of Putative Porcine Embryonic Stem Cells from Cloned Embryos Treated with Trichostatin A". *Cellular Reprogramming* 13 (3) (červen): 205–213. doi:10.1089/cell.2010.0102.
- Wang, Lin-hui, a Zheng-hong Qin. 2006. „Animal Models of Huntington's Disease: Implications in Uncovering Pathogenic Mechanisms and Developing Therapies". *Acta Pharmacologica Sinica* 27 (10) (říjen): 1287–1302. doi:10.1111/j.1745-7254.2006.00410.x.
- Wang, Shufen, Xianghui Tang, Yuyu Niu, Hongwei Chen, Bin Li, Tianqing Li, Xiuzhen Zhang, Zhixin Hu, Qi Zhou, a Weizhi Ji. 2007. „Generation and Characterization of Rabbit Embryonic Stem Cells". *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 25 (2) (únor): 481–489. doi:10.1634/stemcells.2006-0226.
- Wang, Wei, Jian Yang, Hui Liu, Dong Lu, Xiongfeng Chen, Zenon Zenonos, Lia S. Campos, et al. 2011. „Rapid and efficient reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells by retinoic acid receptor gamma and liver receptor homolog 1". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (45) (listopad 8): 18283–18288. doi:10.1073/pnas.1100893108.
- Warren, Luigi, Philip D Manos, Tim Ahfeldt, Yuin-Han Loh, Hu Li, Frank Lau, Wataru Ebina, et al. 2010. „Highly Efficient Reprogramming to Pluripotency and Directed Differentiation of Human Cells with Synthetic Modified mRNA". *Cell Stem Cell* 7 (5) (listopad 5): 618–630. doi:10.1016/j.stem.2010.08.012.
- Watanabe, S, H Umehara, K Murayama, M Okabe, T Kimura, a T Nakano. 2006. „Activation of Akt Signaling Is Sufficient to Maintain Pluripotency in Mouse and

- Primate Embryonic Stem Cells". *Oncogene* 25 (19) (květen 4): 2697–2707. doi:10.1038/sj.onc.1209307.
- Wernersson, Rasmus, Mikkel Schierup, Frank Jørgensen, Jan Gorodkin, Frank Panitz, Hans-Henrik Stærfeldt, Ole Christensen, et al. 2005. „Pigs in Sequence Space: A 0.66X Coverage Pig Genome Survey Based on Shotgun Sequencing". *BMC Genomics* 6 (1) (květen 10): 70. doi:10.1186/1471-2164-6-70.
- Wernig, Marius, Christopher J Lengner, Jacob Hanna, Michael A Lodato, Eveline Steine, Ruth Foreman, Judith Staerk, Styliani Markoulaki, a Rudolf Jaenisch. 2008a. „A Drug-inducible Transgenic System for Direct Reprogramming of Multiple Somatic Cell Types". *Nature Biotechnology* 26 (8) (srpen): 916–924. doi:10.1038/nbt1483.
- Wernig, Marius, Alexander Meissner, Ruth Foreman, Tobias Brambrink, Manching Ku, Konrad Hochedlinger, Bradley E Bernstein, a Rudolf Jaenisch. 2007. „In Vitro Reprogramming of Fibroblasts into a Pluripotent ES-cell-like State". *Nature* 448 (7151) (červenec 19): 318–324. doi:10.1038/nature05944.
- Wernig, Marius, Jian-Ping Zhao, Jan Pruszk, Eva Hedlund, Dongdong Fu, Frank Soldner, Vania Broccoli, Martha Constantine-Paton, Ole Isacson, a Rudolf Jaenisch. 2008b. „Neurons Derived from Reprogrammed Fibroblasts Functionally Integrate into the Fetal Brain and Improve Symptoms of Rats with Parkinson's Disease". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (15) (duben 15): 5856–5861. doi:10.1073/pnas.0801677105.
- West, Franklin D, Steve L Terlow, Dae Jin Kwon, Jennifer L Mumaw, Sujoy K Dhara, Kowser Hasneen, John R Dobrinsky, a Steven L Stice. 2010. „Porcine Induced Pluripotent Stem Cells Produce Chimeric Offspring". *Stem Cells and Development* 19 (8) (srpen): 1211–1220. doi:10.1089/scd.2009.0458.
- Wojda, Urszula, a Jacek Kuznicki. 2013. „Alzheimer's Disease Modeling: Ups, Downs, and Perspectives for Human Induced Pluripotent Stem Cells". *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 34 (3): 563–588. doi:10.3233/JAD-121984.
- Wolf, X A, M A Rasmussen, K Schauer, A T Jensen, M Schmidt, a P Hyttel. 2011. „OCT4 expression in outgrowth colonies derived from porcine inner cell masses and epiblasts". *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* 46 (3) (červen): 385–392. doi:10.1111/j.1439-0531.2010.01675.x.
- Wolf, Xenia Asbæk, Palle Serup, a Poul Hyttel. 2011. „Three-dimensional localisation of NANOG, OCT4, and E-CADHERIN in porcine pre- and peri-implantation embryos". *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* 240 (1) (leden): 204–210. doi:10.1002/dvdy.22491.
- Woltjen, Knut, Iacovos P Michael, Paria Mohseni, Ridham Desai, Maria Mileikovsky, Riikka Hämäläinen, Rebecca Cowling, et al. 2009. „piggyBac Transposition Reprograms Fibroblasts to Induced Pluripotent Stem Cells". *Nature* 458 (7239) (duben 9): 766–770. doi:10.1038/nature07863.
- Wu, Sareina Chiung-Yuan, Yaa-Jyuhn James Meir, Craig J Coates, Alfred M Handler, Pawel Pelczar, Stefan Moisyadi, a Joseph M Kaminski. 2006. „piggyBac Is a Flexible and Highly Active Transposon as Compared to Sleeping Beauty, Tol2, and Mos1 in Mammalian Cells". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (41) (říjen 10): 15008–15013. doi:10.1073/pnas.0606979103.
- Wu, Zhao, Jijun Chen, Jiangtao Ren, Lei Bao, Jing Liao, Chun Cui, Linjun Rao, et al. 2009. „Generation of Pig Induced Pluripotent Stem Cells with a Drug-Inducible System". *Journal of Molecular Cell Biology* 1 (1) (leden 10): 46–54. doi:10.1093/jmcb/mjp003.
- Xu, Ren-He, Tori L. Barron, Feng Gu, Sierra Root, Ruthann M. Peck, Guangjin Pan, Junying Yu, et al. 2008. „NANOG is a Direct Target of TGF $\beta$ /Activin Mediated SMAD Signaling in Human ES Cells". *Cell stem cell* 3 (2) (srpen 7): 196–206. doi:10.1016/j.stem.2008.07.001.
- Xu, Ren-He, Xin Chen, Dong S Li, Rui Li, Gregory C Addicks, Clay Glennon, Thomas P Zwaka, a James A Thomson. 2002. „BMP4 Initiates Human Embryonic Stem Cell

- Differentiation to Trophoblast". *Nature Biotechnology* 20 (12) (prosinec): 1261–1264. doi:10.1038/nbt761.
- Xu, Ren-He, Ruthann M Peck, Dong S Li, Xuezhu Feng, Tenneille Ludwig, a James A Thomson. 2005. „Basic FGF and Suppression of BMP Signaling Sustain Undifferentiated Proliferation of Human ES Cells". *Nature Methods* 2 (3) (březen): 185–190. doi:10.1038/nmeth744.
- Xue, Fei, Yinghong Ma, Y Eugene Chen, Jifeng Zhang, Tzu-An Lin, Chien-Hong Chen, Wei-Wen Lin, et al. 2012. „Recombinant Rabbit Leukemia Inhibitory Factor and Rabbit Embryonic Fibroblasts Support the Derivation and Maintenance of Rabbit Embryonic Stem Cells". *Cellular Reprogramming* 14 (4) (srpen): 364–376. doi:10.1089/cell.2012.0001.
- Yang, Dongshan, Chuan-En Wang, Bentian Zhao, Wei Li, Zhen Ouyang, Zhaoming Liu, Huaqiang Yang, et al. 2010. „Expression of Huntington's Disease Protein Results in Apoptotic Neurons in the Brains of Cloned Transgenic Pigs". *Human Molecular Genetics* 19 (20) (říjen 15): 3983–3994. doi:10.1093/hmg/ddq313.
- Yang, Shang-Hsun, a Anthony W S Chan. 2011. „Transgenic Animal Models of Huntington's Disease". *Current Topics in Behavioral Neurosciences* 7: 61–85. doi:10.1007/7854\_2010\_105.
- Yang, Shang-Hsun, Pei-Hsun Cheng, Heather Banta, Karolina Piotrowska-Nitsche, Jin-Jing Yang, Eric C H Cheng, Brooke Snyder, et al. 2008. „Towards a Transgenic Model of Huntington's Disease in a Non-human Primate". *Nature* 453 (7197) (červen 12): 921–924. doi:10.1038/nature06975.
- Ying, Qi Long, Jennifer Nichols, Ian Chambers, a Austin Smith. 2003. „BMP Induction of Id Proteins Suppresses Differentiation and Sustains Embryonic Stem Cell Self-renewal in Collaboration with STAT3". *Cell* 115 (3) (říjen 31): 281–292.
- Ying, Qi-Long, Jason Wray, Jennifer Nichols, Laura Batlle-Morera, Bradley Doble, James Woodgett, Philip Cohen, a Austin Smith. 2008. „The ground state of embryonic stem cell self-renewal". *Nature* 453 (7194) (květen 22): 519–523. doi:10.1038/nature06968.
- Yu, Junying, Kejin Hu, Kim Smuga-Otto, Shulan Tian, Ron Stewart, Igor I Slukvin, a James A Thomson. 2009. „Human Induced Pluripotent Stem Cells Free of Vector and Transgene Sequences". *Science (New York, N.Y.)* 324 (5928) (květen 8): 797–801. doi:10.1126/science.1172482.
- Yu, Junying, Maxim A Vodyanik, Kim Smuga-Otto, Jessica Antosiewicz-Bourget, Jennifer L Frane, Shulan Tian, Jeff Nie, et al. 2007. „Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells". *Science (New York, N.Y.)* 318 (5858) (prosinec 21): 1917–1920. doi:10.1126/science.1151526.
- Yu, Xianfeng, Guangzhen Jin, Xijun Yin, Sujin Cho, Jintae Jeon, Sangsuk Lee, a Ilkeun Kong. 2008. „Isolation and Characterization of Embryonic Stem-like Cells Derived from in Vivo-produced Cat Blastocysts". *Molecular Reproduction and Development* 75 (9) (září): 1426–1432. doi:10.1002/mrd.20867.
- Yusa, Kosuke, Roland Rad, Junji Takeda, a Allan Bradley. 2009. „Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon". *Nature methods* 6 (5) (květen): 363–369. doi:10.1038/nmeth.1323.
- Zhao, Yuncheng, Jiapeng Lin, Liqin Wang, Bo Chen, Chuan Zhou, Tong Chen, Meiying Guo, et al. 2011. „Derivation and Characterization of Ovine Embryonic Stem-like Cell Lines in Semi-defined Medium Without Feeder Cells". *Journal of Experimental Zoology. Part A, Ecological Genetics and Physiology* 315 (10) (prosinec 1): 639–648. doi:10.1002/jez.715.
- Zhou, Hongyan, Shili Wu, Jin Young Joo, Saiyong Zhu, Dong Wook Han, Tongxiang Lin, Sunia Trauger, et al. 2009. „Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Using Recombinant Proteins". *Cell Stem Cell* 4 (5) (květen 8): 381–384. doi:10.1016/j.stem.2009.04.005.

Zhu, S-X, Z Sun, a J-P Zhang. 2007. „Ovine (Ovis Aries) Blastula from an in Vitro Production System and Isolation of Primary Embryonic Stem Cells". *Zygote (Cambridge, England)* 15 (1) (únor): 35–41. doi:10.1017/S0967199406003959.

Zuccato, Chiara, Marta Valenza, a Elena Cattaneo. 2010. „Molecular mechanisms and potential therapeutical targets in Huntington's disease". *Physiological reviews* 90 (3) (červenec): 905–981. doi:10.1152/physrev.00041.2009.

Zufferey, Romain, John E. Donello, Didier Trono, a Thomas J. Hope. 1999. „Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element Enhances Expression of Transgenes Delivered by Retroviral Vectors". *Journal of Virology* 73 (4) (duben): 2886–2892.

Baxa, Hruska-Plochana , Juhas, Vodicka, Pavlok, Juhasova, Miyanochara, Nejime, Klima, Macakova, Marsala, Weiss, Kubickova, Musilova, Vrtel, Sontag, Thompson, Schierl, Hansikova, Howland, Cattaneo, DiFiglia, Marsala and Motlik. 2013. „A Transgenic Minipig Model of Huntington's Disease". *Journal of Huntington's disease*. (2) 47–68. DOI 10.3233/JHD-130001

Bertram, von Holst, Muster. 2011. „Optimization of mouse neural stem/progenitor cell (NSC) transfection with the 4D-Nucleofector™ system". BioResearch, Lonza.

Cell & Transfection database, Lonza, <http://bio.lonza.com/6.html>, 27. 7. 2013.

<http://www.lcsciences.com/applications/transcriptomics/mirna-profiling/mirna/mirna-available-arrays/pig-array-content/>, 10. 8. 2013.

[http://www.biocat.com/cgi-bin/page/sub1.pl?main\\_group=genomics&sub1=piggybac\\_transposon\\_system](http://www.biocat.com/cgi-bin/page/sub1.pl?main_group=genomics&sub1=piggybac_transposon_system), 1. 8. 2013.

<http://en.wikipedia.org/wiki/Striatum>, 20. 7. 2013.